

PCT/KR9 9/00347

RO/KR 10.9.1999.

KR99/347

대한민국 특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

RECD 20 SEP 1999

WIPO PCT

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함. 5

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 1999년 특허출원 제25143호
Application Number

출원년월일 : 1999년 6월 29일
Date of Application

출원인 : 주식회사 대웅제약
Applicant(s)

PRIORITY
DOCUMENT

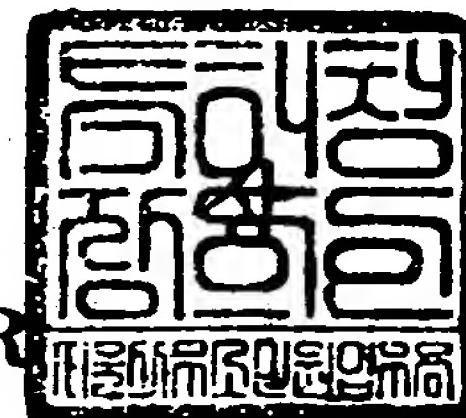
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999년 7월 19일



특허청

COMMISSIONER





919980003859



10111010000000000000

방 식 심 사 란	당 당	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 1999.06.29

【발명의 국문명칭】 생체내 혈소판 증식효능이 향상된 신규한 트롬보포이에틴 유도체

【발명의 영문명칭】 A novel human thrombopoietin mutein

【출원인】

【명칭】 주식회사 대웅제약

【출원인코드】 1-1998-000709-3

【대리인】

【성명】 이원희

【대리인코드】 9-1998-000385-9

【포괄위임등록번호】 1999-024049-7

【발명자】

【성명의 국문표기】 정주영

【성명의 영문표기】 CHUNG, Joo Young

【주민등록번호】 651221-1403013

【우편번호】 463-060

【주소】 경기도 성남시 분당구 이매동 한신아파트 210동 1204호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박상규

【성명의 영문표기】 PARK, Sang Kyu

【주민등록번호】 700813-1010013

【우편번호】 131-141

【주소】 서울특별시 중랑구 룩1동 177-3

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 주상명

【성명의 영문표기】 JU,Sang Myoung

【주민등록번호】 670228-1074410

【우편번호】 463-010

【주소】 경기도 성남시 분당구 정자동 한솔주공아파트 408동 401호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 안혜경

【성명의 영문표기】 AHN,Hyea Kyung

【주민등록번호】 711007-2231718

【우편번호】 463-060

【주소】 경기도 성남시 분당구 이매동 이매촌청구아파트 609동 1305호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 임승욱

【성명의 영문표기】 LIM,Seung Wook

【주민등록번호】 660311-1030117

【우편번호】 461-160

【주소】 경기도 성남시 수정구 신흥동 2024 두산아파트 106동 702호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 장우익

【성명의 영문표기】 CHANG,Woo Ik

【주민등록번호】 700412-1626117

【우편번호】 435-040

【주소】 경기도 군포시 산본동 1156-1 한라주공아파트 409동 1103호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박승국

【성명의 영문표기】 PARK, Seung Kook

【주민등록번호】 630327-1253727

【우편번호】 462-120

【주소】 경기도 성남시 중원구 상대원동 산 19-4 산호아파트 409호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 고여욱

【성명의 영문표기】 KOH, Yeo Wook

【주민등록번호】 630926-1057011

【우편번호】 463-050

【주소】 경기도 성남시 분당구 서현동 시범 한신아파트 126동 601호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박지수

【성명의 영문표기】 PARK, Ji Soo

【주민등록번호】 691206-1023715

【우편번호】 136-062

【주소】 서울특별시 성북구 돈암2동 538-59

【국적】 KR

【우선권주장】

【출원국명】 KR

【출원종류】 특허

【출원번호】 10-1998-0025935

【출원일자】 1998.06.30

【증명서류】 첨부

【심사청구】 청구

【미생물 기탁】

【기탁기관명】 한국생명공학연구소

【수탁번호】 KCTC 0495BP

【수탁일자】 1998.06.17

【미생물 기탁】

【기탁기관명】 한국생명공학연구소

【수탁번호】 KCTC 0630BP

【수탁일자】 1999.06.08

【미생물 기탁】

【기탁기관명】 한국생명공학연구소

【수탁번호】 KCTC 0631BP

【수탁일자】 1999.06.08

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사
를 청구합니다.

대리인

이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 49 면 49,000 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 12 항 493,000 원

【합계】 597,000 원

【첨부서류】 1. 요약서 · 명세서(도면)_1통

2. 우선권증명서류 및 동 번역문_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 신규한 인간 트롬보포이에틴(human thrombopoietin, 이하 'hTPO'로 약칭함) 유도체 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 유전자 재조합 방법으로 천연형 hTPO 중 특정 위치의 아미노산을 아스파라진 등의 아미노산으로 치환하여 당쇄를 도입함으로써 생체내 (*in vivo*) 혈소판 증식효능을 획기적으로 향상시킨 신규의 hTPO 유도체를 제조하므로 항암치료나 골수이식에 따른 혈소판 감소증의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 10

【명세서】

【발명의 명칭】

생체내 혈소판 증식효능이 향상된 신규한 트롬보포이에틴 유도체{A novel human thrombopoietin mutein}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 오버랩 중합효소연쇄반응을 이용하여 돌연변이 hTPO 유도체 cDNA를 제조하는 과정을 도시한 것이고,
- <2> 1 : 서열 1의 시발체; 2 : 서열 2의 시발체;
- <3> N : N-시발체; C : C-시발체;
- <4> S : 신호서열 (signal sequence);
- <5> 도 2는 돌연변이 hTPO 유도체 유전자를 이동벡터 pBlueBac4에 연결시키는 과정을 나타낸 것이고,
- <6> 도 3은 pCDT 벡터에 돌연변이 hTPO 유도체 cDNA를 클로닝하여 동물 세포 발현벡터를 작제하는 과정을 도시한 것이고,
- <7> 도 4는 M-07e 세포증식 검정법으로 동물 세포에서 발현된 hTPO 유도체의 활성을 측정하여 나타낸 것이고,
- <8> 도 5은 천연형 hTPO을 처리한 마우스로부터 혈소판 수를 측정하는 방법으로 생체내(*in vivo*) 활성을 조사하여 나타낸 것이고,
- <9> 도 6은 동물 세포에서 발현된 hTPO 유도체를 36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 처리한 마우스로부터

터 혈소판 수를 측정하는 방법으로 생체내 활성을 조사하여 나타낸 것이고,

- <22> 레인 2 : 40433 ; 레인 3 : 40434 ;
- <23> 레인 4 : 40449 ; 레인 5 : 40458
- <24> 도 12a와 도 12b는 각각 정제된 천연형 hTPO (12a)와 40433 유도체 (12b)를 트롬빈으로 처리한 후 시간 경과에 따른 변화양상을 웨스턴 블럿으로 나타낸 것이다.
- <25> 레인 M : 마커 ; 레인 1 : 트롬빈 처리 전 ;
- <26> 레인 2 : 트롬빈 처리후 30분 ; 레인 3 : 트롬빈 처리후 1시간 ;
- <27> 레인 4 : 트롬빈 처리후 2시간 ; 레인 5 : 트롬빈 처리후 3시간 ;
- <28> 레인 6 : 트롬빈 처리후 4시간 ; 레인 7 : 트롬빈 처리후 4시간 .

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <29> 본 발명은 생체내 (*in vivo*) 혈소판 증식효능이 향상된 신규한 인간 트롬보포이에틴(human thrombopoietin, 이하 'hTPO'로 약칭함) 유도체 및 그의 제조방법에 관한 것이다.
- <30> 보다 상세하게는 본 발명은 유전자 재조합 방법으로 천연형 hTPO 중 특정 위치의 아미노산을 아스파라진 등의 아미노산으로 치환하여 당쇄를 도입한 신규의 hTPO 유도체, 이를 암호하는 염기 서열, 상기 염기 서열을 포함한 발현벡터 및 그의 제조방법, 발현세포주 그리고 이들을 이용한 hTPO 유도체의 제조방법에 관한 것

이다.

<31> 항암치료 또는 골수이식하는 경우와 기타 여러 원인에 의하여 유발되는 혈소판 감소증(thrombocytopenia)은 골수세포내에 존재하는 혈소판 전구세포인 거핵구 콜로니 형성 전구세포들이 항암치료 또는 골수이식하는 과정에서 파괴되고 이로 인하여 혈소판의 수가 부족하게 됨으로써 유발되는 질병으로서, 가벼운 외적 자극에 의하여 쉽게 출혈이 일어나며, 혈소판 감소증이 심한 경우 외부적인 자극 없이도 출혈이 일어나게 된다. 또한 출혈이 일어난 경우 치혈이 잘 안되기 때문에 심할 경우에는 사망에까지 이르는 심각한 문제가 되고 있다.

<32> 현재까지 이러한 혈소판 감소증을 치료하는 방법으로는 혈소판을 수혈하는 방법이 유일하게 사용되고 있다. 그러나 이는 혈소판 수혈에 필요한 혈액의 제공자가 부족하다는 문제점 이외에 에이즈 바이러스 또는 간염 바이러스 등과 같은 혈액에서 유래한 감염원에 의한 감염 및 외래 혈소판의 수혈에 따른 면역반응의 유발 등과 같은 부작용이 있다.

<33> 혈소판은 거핵구 전구세포로부터 만들어지는 혈액성분으로서, 출혈을 억제하는 기능을 나타내고, 그 수는 간 또는 신장에서 생성되고 분비되는 당단백질인 트롬보포이에틴(thrombopoietin, 이하 'TPO'라 약칭함)에 의하여 조절되는데, TPO는 골수세포내에 존재하는 혈소판의 생산세포인 거핵구 전구세포의 증식과 분화를 촉진시켜 혈소판의 생성을 유도하여 궁극적으로 혈소판 수를 증가시킨다(Lok 등,

Nature, 369: 565-568 (1994); De savage 등, *Nature*, 369: 533-568 (1994)).

<34> TPO 유전자 중 인간 트롬보포이에틴(hTPO)의 유전자가 1994년에 최초로 cDNA 형태로 클로닝된 이후(Lok 등, *Nature*, 369: 565-568 (1994); De savage 등, *Nature*, 369: 533-568 (1994); Miyazaki 등, *Experimental hematol.*, 22: 838 (1994); 국제특허공개 제95/18858호) hTPO가 혈소판 수를 조절하는 기능을 갖고 있음을 이용하여 항암치료 및 골수이식시 유발되는 혈소판 감소증을 치료하고자 임상 실험이 진행되고 있다(Murray 등, *Exp. Hematol.*, 26: 207-216 (1998)).

<35> 이후 천연형 hTPO의 활성을 개선하고자 하는 연구들이 다양하게 진행되고 있는데 이는 크게 3가지 방법으로 접근하고 있다.

<36> hTPO는 세포내에서 353개의 아미노산으로 구성된 전구체로서 발현된 후, 21개 아미노산의 신호서열이 잘리면서 332개의 아미노산으로 구성된 활성형 단백질로 세포외로 분비되는 당단백질이다. hTPO는 적혈구 생성을 증가시키는 적혈구 생성인자인 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO)과 높은 서열 상동성을 갖고 있으며 hTPO의 활성을 나타내는 부위인 처음 151개 아미노산 서열과, hTPO의 세포외 분비, 체내 안정성 등에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되는 상기 서열을 제외한 C-말단 부위의 두가지 영역으로 구분된다(Eaton 등, *Exp. Hematol.*, 25:1-7 (1997)).

<37> 이러한 천연형 hTPO를 변형시키는 첫번째 방법은, hTPO의 C-말단 부위를 결실시키거나 또는 C-말단 부위를 결실시킨 후 새로운 아미노산을 결합시키는 것이

다.

<38> 이러한 방법으로서 암젠(Amgen)사는 hTPO₁₅₁(아미노산 1-151), hTPO₁₇₄(아미노산 1-174) 유도체와 hTPO₁₆₃의 N-말단에 메치오닌-라이신을 첨가시킨 유도체를 제조하였다. 그러나 상기 유도체들은 시험관내 실험에서 활성이 유지되는 반면 생체내 실험 결과 천연형 hTPO 보다 활성이 저하된 것으로 나타났다(국제특허공개 제95/26746호, 국제특허공개 제95/25498호).

<39> 또 제넨텍(Genetech)사의 경우 N-말단에 메치오닌을 첨가한 hTPO₁₅₃ 유도체를 대장균에서 발현시켜 제조하였고(국제특허공개 제95/18858호), 기린(Kirin)사의 경우 C-말단부위를 결실시킨 여러 유도체와 hTPO₁₆₃내의 특정 아미노산을 치환시키거나 결실 또는 삽입시킨 유도체들을 제조하였으며(국제특허공개 제95/21919호), 그 외에 지모제네틱스(ZymoGenetics)사(국제특허공개 제95/21920호, 국제특허공개 제95/17062호) 및 지디셀(G. D. Searl)사(국제특허공개 제 96/23888호)와 같은 연구기관에서 TPO의 C-말단부위를 결실시킨 여러 유도체들을 제조하였으나, 모두 생체내 실험결과 천연형 hTPO에 비해 혈소판 생성활성이 우수한 유도체를 만드는데는 실패하였다.

<40> 두번째 방법은 암젠사의 hTPO₁₆₃-PEG와 같이 hTPO 절편에 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, 이하 'PEG'로 약칭함)을 부가하여 유도체를 만드는 것이다(국제특허공개 제95/26746호).

- <41> 그러나, 상기 방법은 hTPO의 안정성에 중요한 역할을 하는 C-말단부위가 없으므로 체내 안정성 저하 및 단백질 접힘(folding)의 변화로 인한 체내 면역학적 방어 시스템에의 노출용이성으로 인한 안전성 저하 그리고 단백질 발현에의 문제점 등이 나타날 수 있다. 또한 PEG가 hTPO 절편에 부가될 때 일정 비율로 부가되지 않으므로 품질의 불균질성 문제를 일으킬 수 있다.
- <42> 또 다른 방법으로는 hTPO에 당쇄를 도입함으로써 hTPO의 활성을 증가시키고자 하는 것이다.
- <43> 이러한 방법으로서 암젠사는 hTPO를 암호하는 cDNA에 있는 특정 염기를 치환시켜 아스파라진-X-세린/트레오닌(X는 프롤린을 제외한 아미노산)의 형태로 돌연변이시킴으로써 C-말단이 결실된 174개 아미노산으로 구성된 hTPO에 N-연결형 당쇄를 하나 이상 도입하여 활성이 증가된 hTPO 유도체를 제조하고자 하였다(국제특허공개 제96/25498호).
- <44> 한국생명공학연구소는 암젠사와는 달리 hTPO를 절단하지 않고 천연형 hTPO에 당쇄를 도입하여 당쇄가 하나 추가된 hTPO 유도체를 제조하였다(박홍록 등, *J. Biol. Chem.*, 273:256-261 (1998)).
- <45> 그러나 생체내 실험결과 이들은 모두 천연형 hTPO 보다 활성이 유의적으로 높게 나타나지는 않았다.
- <46> 상기에서 설명한 바와 같이 생물학적 활성이 향상된 hTPO 유도체를 여러 가지 방법으로 개발하고자 하였으나 모두 천연형보다 생체내 활성이 향상된 hTPO 유도체를 얻는데는 실패하였다.

- <47> 일반적으로 많은 단백질들은 당과 단백질이 결합된 당단백질로 존재한다. 이러한 당쇄화는 단백질의 특정위치에서 발생하며 대개 두가지 종류로 분류되는데, 대개 당의 결사슬이 세린 또는 트레오닌 아미노산의 산소에 부착되는 O-연결형 당쇄화와 아스파라진-X-세린/트레오닌(X는 프롤린을 제외한 아미노산)의 아스파라진의 질소에 부착되는 N-연결형 당쇄화가 있다.
- <48> 당단백질의 당쇄는 단백질의 물리화학적, 생물학적 특성에 많은 영향을 미쳐 단백질의 안정성과 분비에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 생체내 생물학적 활성 및 약물동력학적 성질에 중요한 영향을 준다(Jenkins 등, *Nature Biotechnological.*, 14:975 - 981 (1996); Liu 등, *Act. TIBTECH.*, 10:114 - 120 (1992)).
- <49> 그 예로써 인간 인터페론 감마(human interferon- γ)나 글루코오스 전달 단백질(glucose transport protein)의 경우 N-당쇄 부위가 도입되는 아스파라진 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 당쇄가 도입되지 못하도록 하였을 때, 단백질의 생물학적 활성도가 현저히 감소하는 것으로 나타남으로써 N-당쇄가 당단백질의 활성에 많은 영향을 미치는 것이 확인되었다(Sareneva 등, *Biochemical J.* 303:831 - 840 (1994); Asano 등, *FEBS*, 324:258 - 261 (1993)).
- <50> 그러나 또한 당쇄가 추가로 도입된다고 하여 단백질의 생물학적 활성이 따라서 증가되는 것은 아니다. 이는 상기 암젠사 및 한국생명공학연구소의 선행기술(국제특허공개 제96-25498호; 박홍록 등, *J. Biol. Chem.*, 273:256-261 (1998))들에서

도 확인되는데, 이들의 경우 당쇄가 추가되었지만 단백질의 생물학적 활성은 오히려 천연형보다 감소하였다. 따라서 당쇄가 추가로 도입됨으로써 단백질의 활성이 증가되기 위하여는 당쇄가 많이 붙은 것보다 특정위치에 도입되는 것이 중요하다.

<51> 이에 본 발명자들은 hTPO의 생물학적 활성을 증가시키고자 여러 위치에 당쇄가 도입된 유도체들을 다양하게 제조하여 활성을 측정하여 본 결과 164번 아미노산인 아르기닌을 아스파라진으로 치환한 hTPO 유도체; 193번 아미노산인 트레오닌을 아스파라진으로 치환한 hTPO 유도체; 157번 프롤린 및 164번 아르기닌을 각각 아스파라진으로 치환한 hTPO 유도체; 및 108번 류신, 117번 아르기닌 및 164번 아르기닌을 각각 아스파라진으로 치환한 hTPO 유도체가 놀랍게도 기존의 다른 hTPO 유도체들과는 달리 천연형 hTPO에 비해 현저하게 향상된 생체내 혈소판 생성능력을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<52> 본 발명은 생체내 (*in vivo*)에서 혈소판 생성활성이 천연형 hTPO 보다 향상된 새로운 hTPO 유도체를 제공함에 그 목적이 있다.

<53> 구체적으로, 본 발명은 천연형 hTPO 아미노산 서열 중 특정 위치의 아미노산을 아스파라진 등의 아미노산으로 치환하여 당쇄를 도입함으로써 생체내 (*in vivo*) 혈소판 생성활성이 향상된 hTPO 유도체를 제공한다.

<54> 또한 본 발명은 상기 hTPO 유도체를 암호하는 유전자를 제공한다.

<55> 또한 본 발명은 상기 유전자를 적당한 벡터에 도입한 다음 이 벡터로 숙주 세포를 형질전환하고 이로부터 얻어진 형질전환체를 적당한 배지에서 배양하여 hTPO 유도체를 얻는 hTPO 유도체의 제조방법을 제공한다.

【발명의 구성】

<56> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<57> 본 발명은 천연형 hTPO 아미노산 서열 중 특정 위치의 아미노산을 아스파라진 등의 아미노산으로 치환하여 당쇄를 도입함으로써 생체내 (*in vivo*) 혈소판 생성활성을 향상시킨 hTPO 유도체를 제공한다.

<58> 우선 본 발명은 생체내 (*in vivo*)에서 혈소판 생성활성이 향상된 hTPO 유도체를 개발하기 위하여, hTPO 단백질의 특정부위가 N-당쇄의 도입 부위인 아스파라진-X-세린/트레오닌 (X는 프롤린을 제외한 아미노산) 서열이 되도록 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 당쇄가 하나 이상 도입된 여러 종류의 hTPO 유도체를 제조하였다.

<59> 구체적으로 본 발명은 천연형 hTPO에 당쇄가 하나 이상 추가된 hTPO 유도체를 제조하기 위하여 오버랩 중합효소 연쇄반응 (overlap PCR; Cheng 등, *PNAS*, 91:5695 (1994))에 의한 부위특이 돌연변이법 (site-specific mutagenesis)을 이용하여 천연형의 hTPO의 특정 아미노산이 치환된 hTPO 유도체의 유전자를 분리하였다 (도 1 참조).

<60> 우선, 하기 변이 염기서열을 포함하는 시발체를 화학적으로 합성한다. 이 시

발체는 양 방향의 올리고 뉴클레오파이드로 각각 새롭게 치환시키고자 하는 아미노산의 염기서열을 포함하고 그 서열을 중심으로 5' 방향과 3' 방향으로 hTPO 유전자의 염기 서열에 해당하는 몇 개의 염기가 연결된 한 쌍의 센스 및 안티센스 시발체이다.

<61>

【표 1】

부위 특이 돌연변이 유도를 위한 시발체

유도체	시발체 이름	서열번호	서열
40429	29-N	3	5'-GCTGT GGTGT TGCCC TGTGG-3'
	29-C	4	5'-ACAGG GCAAC ACCAC AGCTC-3'
40430	30-N	5	5'-GGGTT CCGTT TAAAC TCTGC AG-3'
	30-C	6	5'-CTGCA GAGTT TAAAC GGAAC CCAG-3'
40431	31-N	7	5'-AGAGG GTGGA ATTCC CTACA AGCA-3'
	31-C	8	5'-TGCTT GTAGG GAATT CCACC CTCT-3'
40432	32-N	9	5'-GGGCC CGGTT GACGC AGA-3'
	32-C	10	5'-TCTGC GTCAA CCGGG CCC-3'
40433	33-N	11	5'-GGACT AGAGA CGTGT TGCTG GGGAC-3'
	33-C	12	5'-GTCCC CAGCA ACACG TCTCT AGTCC-3'
40434	34-N	13	5'-GAAGC CCAGA TCCGT TAGTT CTGGC-3'
	34-C	14	5'-GCCAG AACTA ACGGA TCTGG GCTTC-3'
40458	58-N	15	5'-AGCTG TGGTG TTTGG GGCCC GC-3'
	58-C	16	5'-GCGGG CCCCA AACAC CACAG CT-3'
	33-N	11	5'-GGACT AGAGA CGTGT TGCTG GGGAC-3'
	33-C	12	5'-GTCCC CAGCA ACACG TCTCT AGTCC-3'
40459	59-N	17	5'-CTAGA GAGGT GCTGT TGACA GCTGT G-3'
	59-C	18	5'-CACAG CTGTC AACAG CAGCA CCTCT CTAG-3'
40460	60-N	19	5'-GGTGG GTGGG GTCCG GTTGA CGCAG AGG-3'
	60-C	20	5'-CCTCT GCGTC AACCG GACCC CACCC ACC-3'
	33-N	11	5'-GGACT AGAGA CGTGT TGCTG GGGAC-3'
	33-C	12	5'-GTCCC CAGCA ACACG TCTCT AGTCC-3'
40461	61-N	21	5'-TCTGC TGGGG GAAGC GTTGG TGGGT GG-3'
	61-C	22	5'-CCACC CACCA ACGCT TCCCC CAGCA GA-3'
	33-N	11	5'-GGACT AGAGA CGTGT TGCTG GGGAC-3'
	33-C	12	5'-GTCCC CAGCA ACACG TCTCT AGTCC-3'
40462	62-N	23	5'-CAGTG TGAGG GTTAG ATTGG TTCTG CTG-3'
	62-C	24	5'-CAGCA GAACC AATCT AACCC TCACA CTG-3'
40463	63-N	25	5'-CAGTG TGAGG TTTAG AGAGG TT-3'
	63-C	26	5'-AACCT CTCTA AACCT CACAC TG-3'
	33-N	11	5'-GGACT AGAGA CGTGT TGCTG GGGAC-3'
	33-C	12	5'-GTCCC CAGCA ACACG TCTCT AGTCC-3'

- <62> 오버랩 PCR (overlap PCR)은, 구체적으로 hTPO cDNA 유전자가 클로닝되어 있는 공지의 이동벡터 pBlue404 (대한민국 특허출원 제 97-7512호)를 주형으로 하고, hTPO 신호서열을 암호화하는 염기 서열을 포함하는 서열 1의 올리고 뉴클레오타이드 및 상기 표 1의 변이 염기서열을 포함하는 올리고 뉴클레오타이드 쌍 중 N-시발체, 또는 나머지 C-시발체와 hTPO C-말단 전사해독틀 부분과 종결코돈을 포함하는 서열 2의 올리고 뉴클레오타이드를 각각 시발체로 하여 수행하였다.
- <63> 상기 오버랩 PCR의 산물은 hTPO 유전자의 신호서열을 포함하고 N-말단에서 아미노산 치환 부위까지에 해당하는 염기 서열과, 아미노산 치환 부위에서 C-말단 까지에 해당하는 염기 서열을 포함하게 된다.
- <64> 아미노산 변이가 일어날 염기서열 부위를 포함하는 완전한 길이의 hTPO cDNA 유전자를 얻기 위하여, 상기 두 오버랩 PCR 산물을 주형으로 하고 상기 서열 1 및 서열 2의 올리고 뉴클레오타이드를 시발체로 하여 PCR을 수행하였다.
- <65> 이러한 과정으로 1078 bp의 변이 염기서열 부위를 포함하는 완전한 길이의 hTPO 유도체 cDNA를 제조하였다(도 1 참조).
- <66> 상기 과정으로 제조한 hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 형질전환체를 제조하기 위하여 먼저 hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 이동벡터를 제조하고 이 벡터를 이용하여 발현벡터를 제조하였다.
- <67> 구체적으로 공지의 이동벡터 pBlueBac4와 각 hTPO 유도체 유전자를 제한효소

*Bgl*II 및 *Eco*RI으로 각각 절단하고 T4 DNA 라이게이즈(T4 DNA ligase)로 연결하여 각 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 이동벡터를 얻었다(도 2 참조).

<68> 상기에서 얻어진 이동벡터의 종류와, 그 이동벡터내의 변화된 hTPO 유도체 유전자 서열과 그로 인해 치환되는 아미노산 부위를 하기 표 2에 나타내었다.

<69> 본 발명에서 hTPO 유도체의 아미노산 서열은 서열 30으로 기재되는 천연형 hTPO 의 아미노산 서열로부터 치환시킨 아미노산 서열을 표기하는 방법으로 나타낸다. 예를 들어, 본 발명의 hTPO 유도체 40430의 아미노산 서열은 [Asn¹⁰⁸] hTPO 로 표기되며, 이는 서열 30의 아미노산 서열에서 108번 아미노산 잔기가 아스파라진으로 치환된 아미노산 서열과 일치한다.

<70> 【표 2】

hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 이동벡터 및 치환된 아미노산 서열과 유전자 서열

이동벡터	아미노산 변이	염기 변이
pBlue29	R ¹¹⁷ → N ¹¹⁷	AGG → AAC
pBlue30	L ¹⁰⁸ → N ¹⁰⁸	CTT → AAT
pBlue31	G ¹⁴⁶ G ¹⁴⁷ → G ¹⁴⁶ N ¹⁴⁷	GGAGGG → GGGAAAT
pBlue32	R ¹⁵³ → N ¹⁵³	AGG → AAC
pBlue33	R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵	AGAACCC → AACACG
pBlue34	T ¹⁹³ G ¹⁹⁴ → N ¹⁹³ G ¹⁹⁴	ACTGGT → AACGGA
pBlue58	P ¹⁵⁷ → N ¹⁵⁷ R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵	CCC → AAC AGAACCC → AACACG
pBlue59	R ¹⁶² , R ¹⁶⁴ → N ¹⁶² , S ¹⁶⁴	CCC, AGA → AAC, AGC
pBlue60	R ¹⁵³ , A ¹⁵⁵ → N ¹⁵³ , T ¹⁵⁵ R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵	AGG, GCC → AAC, ACC AGAACCC → AACACG
pBlue61	T ¹⁵⁹ , V ¹⁶¹ → N ¹⁵⁹ , S ¹⁶¹ R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵	ACA, GTC → AAC, TCC AGAACCC → AACACG
pBlue62	S ¹⁶⁶ , V ¹⁶⁸ → N ¹⁶⁶ , T ¹⁶⁸	TCT, GTC → AAT, ACC
pBlue63	R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ V ¹⁶⁸ → N ¹⁶⁸	AGAACCC → AACACG GTC → AAC

<71> 상기 이동벡터를 동물세포에 형질전환시키기 위하여 포유동물세포 발현벡터를 제조하였다.

<72> 구체적으로 천연형 hTP0의 cDNA를 공지의 pCDNA3.1 벡터에 삽입하여 제조한 pCDT 벡터와 상기의 hTP0 유도체 유전자를 포함하는 이동벡터 pBlue29, pBlue30, pBlue31, pBlue32, pBlue33, pBlue34, pBlue58, pBlue59, pBlue60, pBlue61, pBlue62, pBlue63을 제한효소 *Nhe*I 및 *Eco*RI으로 각각 절단하고 T4 DNA 라이제이즈로 연결하여 각 hTP0 유도체 유전자를 포함하는 동물세포 발현벡터를 얻었다(도 3 및 표 3 참조).

<73> 【표 3】

hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 동물세포 발현벡터 및 치환된 아미노산 서열과 유전자 서열

발현벡터	아미노산 변이	염기 변이
p40429	R ¹¹⁷ → N ¹¹⁷	AGG → AAC
p40430	L ¹⁰⁸ → N ¹⁰⁸	CTT → AAT
p40431	G ¹⁴⁶ G ¹⁴⁷ → G ¹⁴⁶ N ¹⁴⁷	GGAGGG → GGGAAAT
p40432	R ¹⁵³ → N ¹⁵³	AGG → AAC
p40433	R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵	AGAACCC → AACACG
p40434	T ¹⁹³ G ¹⁹⁴ → N ¹⁹³ G ¹⁹⁴	ACTGGT → AACCGA
p40435	p40429 + p40431	
p40436	p40429 + p40433	
p40437	p40430 + p40431	
p40438	p40430 + p40433	
p40439	p40431 + p40433	
p40446	p40429 + p40431 + p40433	
p40447	p40430 + p40431 + p40433	
p40449	p40429 + p40430 + p40433	
p40458	P ¹⁵⁷ → N ¹⁵⁷ R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵	CCC → AAC AGAACCC → AACACG
p40459	R ¹⁶² , R ¹⁶⁴ → N ¹⁶² , S ¹⁶⁴	CCC, AGA → AAC, AGC
p40460	R ¹⁵³ , A ¹⁵⁵ → N ¹⁵³ , T ¹⁵⁵ R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵	AGG, GCC → AAC, ACC AGAACCC → AACACG
p40461	T ¹⁵⁹ , V ¹⁶¹ → N ¹⁵⁹ , S ¹⁶¹ R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵	ACA, GTC → AAC, TCC AGAACCC → AACACG
p40462	S ¹⁶⁶ , V ¹⁶⁸ → N ¹⁶⁶ , T ¹⁶⁸	TCT, GTC → AAT, ACC
p40463	R ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ → N ¹⁶⁴ T ¹⁶⁵ V ¹⁶⁸ → N ¹⁶⁸	AGAACCC → AACACG GTC → AAC

<74> 이 때, 유전 암호 서열의 디제너리시(degeneracy)에 기인하여 표 3에 표시된 DNA 서열과는 다르지만 표 3의 아미노산 서열을 암호하는 조건에 부합하는 다른 염기 서열도 본 발명의 범주에 포함된다. 즉, 본 발명에서 상기 표 3의 변화된 아미노산 서열을 포함하는 hTPO 유도체의 아미노산 서열을 암호하는 모든 염기 서열이 돌연변이 hTPO 유전자의 염기 서열로 이용될 수 있다.

<75> 예를 들어 서열 11과 서열 12의 염기서열을 가지는 시발체에 의해 돌연변이가 도입된 hTPO 유도체 발현벡터 p40433에 의해 발현되는 hTPO 유도체는 서열 30의 아미노산 서열에서 164번 아미노산이 아스파라진으로 치환된 폴리펩티드를 포함하고, 이를 암호하는 염기 서열은 서열 31의 염기 서열뿐 아니라 유전 암호 서열의 디제너리시에 의한 동종의 염기 서열을 포함한다.

<76> 상기에서 제조한 이동벡터에 돌연변이가 바르게 도입되었는지 확인하기 위하여, PCR 산물의 염기 서열을 결정할 수도 있지만, 돌연변이 유도 시발체의 제작시에 시발체의 염기 서열에 새로운 제한효소 부위를 도입하거나 또는 주형에 있던 제한효소 부위가 소멸되도록 하여 돌연변이 유전자를 만들고 나서 특정 제한효소로 반응시켜보면 DNA 염기서열 분석을 하지 않고도 간편하게 돌연변이가 도입되었는지 여부를 판단할 수 있다. 예를 들어 발현벡터 p40433의 경우 돌연변이가 도입되면, 천연형 hTPO의 염기서열 GAACCT가 ACACGT로 바뀌게 되어 제한효소 *Af*I^{III}의 새로운 절단부위를 생성하게 된다. 따라서 발현벡터 p40433을 제한효소 *Af*I^{III}로 반응시켜 보면 돌연변이의 도입 유무를 쉽게 확인할 수 있다.

<77> 또한 본 발명은 hTPO 내의 두 부위 이상에 당쇄를 도입하기 위하여 상기 hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 발현벡터를 이용하여 hTPO 단백질의 서로 다른 두 개 이상의 아미노산이 치환된 유도체를 제조하였다.

<78> 구체적으로 각 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 동물세포 발현벡터 두 종을

제한효소로 각각 절단하고 상기 pCDT 벡터에 클로닝하여 서로 다른 두 부위 또는 세 부위의 아미노산이 치환된 hTP0 유도체 유전자를 포함하는 발현벡터를 얻는다. 그 예로서 발현벡터 p40429를 제한효소 *Nhe* I 및 *BspM* I으로 절단하여 Arg¹¹⁷→Asn¹¹⁷의 아미노산 치환부위가 포함된 DNA 절편을 분리하고, 발현벡터 p40431를 제한효소 *BspM* I 및 *Bsu36* I로 절단하여 Gly¹⁴⁷→Asn¹⁴⁷의 아미노산 치환부위가 포함된 DNA 절편을 분리한 다음 pCDT 벡터를 *BspM* I 및 *Bsu36* I으로 절단하고 이를 연결시킴으로써 Arg¹¹⁷→Asn¹¹⁷와 Gly¹⁴⁷→Asn¹⁴⁷의 두 아미노산 치환 부위가 도입된 유전자를 포함한 발현벡터 p40435를 얻었다. 이와 같은 방법으로 p40436 내지 p40439와 p40446 내지 p40449를 제조하였다(표 3 참조).

- <79> 상기에서 제조한 발현벡터를 이용하여 hTP0 유도체를 발현하는 동물세포 형질전환체를 제조하였다.
- <80> 구체적으로 상기 발현벡터를 리포펙타민 방법을 이용하여 동물세포 CHO/K-1에 형질전환시켜 각각의 hTP0 유도체를 발현하는 동물세포 형질전환체를 제조하였다.
- <81> 상기 형질전환 세포주를 벡터 이름에 맞추어 CHO K-1/p40429, CHO K-1/p40430, CHO K-1/p40431, CHO K-1/p40432 등으로 명명하고 이 중 CHO K-1/p40433을 국제기탁기관인 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 1998년 6월 17일자로 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 0495BP).

<82> 상기 동물세포 형질전환체를 배양하여 이로부터 동물세포에서 발현된 hTPO 유도체를 제조하였다.

<83> 구체적으로 형질전환체를 혈청이 함유된 배지에서 대량으로 계대배양한 다음 분비 배지로 교체배양하여 배양 상등액을 얻고, 이를 농축, 투석하여 hTPO 유도체를 얻었다.

<84> 상기 CHO K-1/p40433을 배양하여 분리한 hTP0 유도체는 서열 30의 아미노산
서열에서 164번 아르기닌이 아스파라진으로 치환된 폴리펩티드 [Asn^{164}] hTP0 이다.

<85> 상기 CHO K-1/p40434를 배양하여 분리한 hTPO 유도체는 서열 30의 아미노산 서열에서 193번 트레오닌이 아스파라진으로 치환된 폴리펩티드 [Asn^{193}] hTPO 이다.

<86> 상기 CHO K-1/p40449를 배양하여 분리한 hTP0 유도체는 서열 30의 아미노산
서열에서 108번 류신, 117번 아르기닌, 164번 아르기닌이 각각 아스파라진으로 치
환된 폴리펩티드 [Asn^{108} , Asn^{117} , Asn^{164}] hTP0 이다.

<87> 상기 CHO K-1/p40458을 배양하여 분리한 hTPO 유도체는 서열 30의 아미노산 서열에서 157번 프롤린, 164번 아르기닌이 각각 아스파라진으로 치환된 폴리펩티드 $[Asn^{157}, Asn^{164}]$ hTPO 이다.

<88> 상기 동물세포에서 발현된 hTP0 유도체들을 벡터 이름에 따라 40429 내지

40439, 40446, 40447, 40449, 40458 내지 40463으로 명명하고 이들의 시험관내(*in vitro*) 생물학적 활성을 조사하기 위하여 거핵구세포성 백혈병 세포주의 세포증식 검정법을 수행하였다.

<89> 그 결과 40429, 40430, 40432, 40433, 40434, 40437, 40438, 40439 유도체 등이 천연형 hTPO 보다 우수한 생물학적 활성을 보였으며, 당쇄가 하나 도입된 경우와 두 개가 도입된 경우 각각 활성이 증가한 것들과 저하된 것들이 모두 나오는 것으로 보아 도입된 수와 활성과의 비례적 관계는 없는 것으로 나타났다(도 4 참조).

<90> 상기 hTPO 유도체들의 생체내(*in vivo*) 생물학적 활성을 조사하기 위하여, hTPO 유도체들을 마우스에 투여하여 혈소판 수를 측정하였다.

<91> 구체적으로, 8주령 정도의 마우스를 평균체중을 기준으로 4-5군으로 나누어 일정한 농도의 hTPO를 피하투여한다. 투여후 말초혈의 채혈을 실시하여 말초혈 중의 혈소판수를 측정한 결과 대부분의 유도체군들은 천연형 hTPO 보다 혈소판 생성 효과가 저하된 것으로 나타난 반면, 40433 유도체, 40434 유도체, 40449 유도체, 40458 유도체는 그 효과가 천연형 hTPO와 유사하거나 우수한 것으로 나타났다(도 6, 도 7a 및 도 7b 참조).

<92> 상기 실험결과 hTPO의 생체내 활성은 도입된 당쇄수가 많을수록 증가하는 것 이 아니라 도입되는 부위와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 즉, hTPO의 활성이 증가하기 위하여는 당쇄가 hTPO의 332개 아미노산 서열 중 특정위치, 이를테면 164

번 또는 193번 등에 도입되어야 함을 알 수 있다.

<93> 특히 40433 유도체의 경우 생체내 혈소판 생성활성이 투여후 3-4일이 경과된 후부터 약 2일간 천연형 hTPO 보다 활성이 높게 나타나, 임상적으로 혈소판 감소증 치료제 등으로 유용하게 사용될 수 있음이 확인되었다. 40433 유도체의 혈소판 생성활성의 최고치는 투여후 5일째에 천연형 hTPO 보다 34% 이상 현저히 향상된 결과를 보였으며, 전체적으로는 천연형이 나타내는 활성보다 80% 이상으로 증가된 활성을 나타내었다.

<94> 상기 실험결과에서 천연형 hTPO에 비해 활성이 같거나 그 이상인 유도체의 생체내 활성을 조사하기 위하여, 상기에서 제작된 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 dhfr 증폭발현벡터를 제조하여 hTPO 유도체의 발현 효율이 높아진 세포주를 제조하였다.

<95> 구체적으로, dhfr 유전자를 포함하는 벡터 pSV2-dhfr의 Pvull-SphI 절편에 BamHI 링커 (linker)를 붙여서 dhfr 유전자를 함유한 1710 bp 단편을 얻은 후, 이를 pCDT에 삽입하여 천연형 hTPO 유전자를 포함하는 dhfr 증폭발현벡터인 pDCT를 제조하였다. 앞서 제조한 본 발명의 hTPO 유도체 유전자를 상기 pDCT에 천연형 hTPO 유전자 대신 삽입하여, hTPO 유도체 유전자를 포함하는 dhfr 증폭발현벡터 pD40433, pD40434, pD40449, pD40458을 제조한다 (도 8 참조).

<96> 상기와 같이 제작된 hTPO 유도체 유전자를 포함한 dhfr 발현벡터는 진핵세포 주에 형질전환된 후, 계대 배양에 의해 상기 세포주의 염색체 속에서 손쉽게 증폭

된다. 보다 상세하게 본 발명에서는 이를 동물세포 CHO/dhfr(-)에 형질전환시킨다. 상기와 같이 만든 새로운 형질전환된 세포주를 각각 CHO dhfr-/pD40433, CHO dhfr-/pD40434, CHO dhfr-/pD40449, CHO dhfr-/pD40458 이라 명명하고 이 중 CHO dhfr-/pD40434, CHO dhfr-/pD40449, CHO dhfr-/pD40458 을 국제기탁기관인 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 1999년 6월 8일자로 기탁하였다 (수탁번호 : KCTC 0630BP, KCTC 0631BP, KCTC 0632BP). 상기와 같은 방법으로 다른 hTPO 유도체들을 포함하는 dhfr 벡터와 그 형질전환 세포주를 용이하게 얻을 수 있다.

<97> 상기 세포주는 대량 배양이 가능하므로, 이로부터 각 유도체를 공지의 방법을 사용하여 정제할 수 있다. 상기 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 dhfr 증폭발현 벡터로 형질전환된 세포주로부터 hTPO 유도체를 정제하기 위해서 다양한 칼럼 크로마토그래피를 이용할 수 있는데, 본 발명에서는 CM 이온교환 친화 칼럼, 페닐세파로즈 칼럼, 히드록실아파티트 칼럼 등을 조합 사용하여 정제하였다 (도 9 참조).

<98> 상기 정제된 hTPO 유도체들의 생체내 생물학적 활성을 조사하기 위하여, 상기에서 언급한 방법으로 각 정제된 hTPO 유도체들을 마우스에 투여하여 혈소판 수를 측정하였다. 그 결과 투여일로부터 10일째까지 천연형 hTPO에 비해 40433 유도체는 77%, 40434 유도체는 91%, 40449 유도체는 26%, 40458 유도체는 79% 씩 증가된 활성을 나타내었다(도 10 참조).

<99> 상기 hTPO 유도체들의 당쇄 도입여부를 확인하기 위하여, 정제된 천연형 hTPO 및 hTPO 유도체에 대해 SDS-PAGE 및 웨스턴 블릿 분석을 수행하였다. 그 결과

당쇄가 1개 도입된 40433, 40434 유도체가 천연형 hTPO에 비해 분자량이 증가된 것을 확인할 수 있었고, 마찬가지로 당쇄가 각각 2개, 3개 도입된 40458, 40449 유도체의 분자량도 도입된 당쇄의 수에 따라 비례적으로 증가한 것으로 나타났다(도 11 참조).

<100> 또한 천연형 hTPO와 hTPO 유도체 중 40433을 트롬빈으로 처리한 후, 시간변화에 따른 단백질 띠의 변화양상을 관찰함으로서 hTPO 유도체의 안정성 증가여부를 확인하였다. 그 결과 hTPO 유도체인 40433이 천연형 hTPO에 비해 트롬빈에 대한 안정성이 증가된 것으로 나타났다(도 12 참조). 따라서 당쇄 도입에 의한 안정성 증가가 hTPO 유도체의 생체내 활성 증가에 기여했다고 볼 수 있다.

<101> 본 발명의 hTPO 유도체가 치료용 약제로 이용되기 위해서는 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제(diluent) 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.

<102> 구체적으로 물, 인산 완충액, 또는 엑스트로소 용액, 알부민 용액, 항산화제, 텍스트린 등과 섞어 투여할 수 있으며, 투여 방법으로는 정맥주사 또는 피하주사를 이용하는 것이 바람직하다.

<103> 투여 용량은 천연형보다 상당히 적은 양으로 투여하면 되는데 예를 들면 0.01~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /일로 투여한다.

<104> 본 발명의 hTPO 유도체는 다양한 질환에 의한 혈소판 감소증

(thrombocytopeina)에 사용될 수 있다.

<105> 예를 들면, 항암제 투여, 방사선 요법에 의한 혈소판 감소증, 골수이식에 의한 혈소판 감소증, 간염·간경화에 의한 혈소판 감소증 등의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 상기 질병을 치료하는 방법으로는 아드리아마이신, 시스플라틴 같은 항암제와 병용투여될 수 있고 IL-3, MCSF, SCF, EPO 등과 같은 혈구촉진 사이토카인(hematopoietic cytokine)들과 병용 투여될 수 있다.

<106> 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

<107> 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<108> <실시예 1> PCR에 의한 hTPO 유도체를 암호하는 cDNA의 제조

천연형 hTPO 유전자에 부위 특이 돌연변이를 유도하기 위하여, 아미노산을 치환시킬 특이부위를 포함하는 양 방향의 올리고 뉴클레오타이드 12쌍을 제작하고 그 각각을 상기 표 1과 같이 명명하였다.

<110> hTPO 유전자를 증폭시키기 위한 주형으로는 hTPO cDNA가 클로닝되어 있는 공지의 이동벡터 pBlue404 (대한민국 특허출원 제 97-7512호)를 사용하였다.

<111> 구체적으로 이동벡터 pBlue404 약 50 ng을 주형으로 하고, hTPO 유전자 신호서열의 염기 서열을 포함하는 서열 1의 올리고 뉴클레오타이드와 상기 돌연변이 부위를 포함하는 올리고 뉴클레오타이드 쌍 중 안티센스 올리고 뉴클레오타이드 (표

1의 N-시발체)를 시발체로 사용하여 PCR을 수행하였다. 각각의 시발체를 μl 당 40 pmol이 되도록 녹인 다음, 그 용액 4 μl 에 Pfu(*Pyrococcus furiosus*) 중합효소 (2.5 u/ μl ; Stratagene사, Cat. No. 600153) 1 μl 를 부가하여 최종 100 μl 부피로 하여 PCR 반응을 진행시켰다. PCR은 1차 변성 ; 94°C 90초, 변성 ; 94°C 40초, 시발체 접합 ; 55°C 1분, 신장 반응 ; 72°C 2분 과정을 35회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소 반응을 72°C 5분으로 수행하여 반응을 종료하였다.

<112> 마찬가지로 hTPO 유전자의 C-말단 전사해독틀(open reading frame, ORF) 영역과 종결 코돈을 포함하는 염기 서열을 가지는 서열 2의 올리고 뉴클레오파이드와 상기 돌연변이 부위를 포함하는 올리고 뉴클레오파이드 쌍 중 센스 올리고 뉴클레오파이드 (표 1의 C-시발체)를 시발체로 사용하여 동일한 조건으로 PCR을 수행하였다.

<113> 상기와 같은 과정으로 각각 hTPO 유전자의 신호서열 (signal sequence)을 포함하고 N-말단에서 아미노산 치환 부위까지에 해당하는 유전자 절편과 아미노산 치환 부위에서 C-말단까지에 해당하는 유전자 절편을 얻었다.

<114> 각 PCR 산물은 1% 아가로오즈 겔 전기영동을 수행하여 해당 크기의 DNA 밴드를 면도칼로 잘라내어 큐엑스 II(QIAEX II) 키트(Qiagen사, Cat. No. 20021)를 이용하여 용출하고, 이를 최종적으로 50 μl 가 되도록 삼차증류수에 녹였다.

<115> 상기 PCR 산물로부터 돌연변이 서열을 포함하고 신호서열을 포함하는 332개의 아미노산을 암호하는 완전한 길이의 hTPO cDNA 유전자를 얻기 위해서, 두 PCR 절편 10 ng씩을 주형으로 하고 서열 1과 서열 2의 올리고 뉴클레오파이드를 시발체

로 사용해서 최종 100 μl 부피로 PCR을 진행시켰다. PCR은 1차 변성 ; 94°C 90초, 변성 ; 94°C 40초, 시발체 접합 ; 58°C 1분, 효소 신장 반응 ; 72°C 2분 과정을 35회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소 반응을 72°C 5분으로 수행하여 반응을 종료하였다. PCR 산물은 1% 아가로오즈 겔 전기영동을 수행하고 상기와 같은 방법으로 1078 bp 크기의 DNA 밴드를 분리한 다음 30 μl 의 삼차증류수에 녹였다.

<116> 한편, 두 부위 이상의 돌연변이 서열을 포함하는 hTPO 유전자를 제조하기 위해, 58-N, 58-C 시발체 쌍, 60-N, 60-C 시발체 쌍, 61-N, 61-C 시발체 쌍, 63-N, 63-C 시발체 쌍에 의해 만들어진 cDNA 서열에 다시 한번 상기 돌연변이 유발 과정을 반복하되, 33-N, 33-C 시발체 쌍을 사용하여 돌연변이를 일으켰다.

<117> 상기 과정으로 생성된 hTPO 유도체의 변화된 아미노산 서열과 염기 서열을 상기 표 2에 나타내었다.

<118> <실시예 2> hTPO 유도체 cDNA를 함유한 포유동물세포 발현 벡터의 제조 및 CHO 세포에서의 발현

<119> (2-1) 이동벡터의 제조

<120> 실시예 1에서 제조한 hTPO 유도체 유전자를 먼저 공지의 이동벡터인 pBlueBac4(Invitrogen사, Cat. No. V1995-20)에 하기와 같은 방법으로 클로닝하였다.

<121> 실시예 1에서 준비한 각 hTPO 유도체의 PCR 산물에 *Bgl*II와 *Eco*RI 제한효소를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 다음 1% 아가로오스 겔 전기영동으로

1068 bp의 DNA 절편을 분리하였다. pBlueBac4 벡터는 제한효소 *Bgl*II 및 *Eco*RI으로 상기의 조건에서 절단하여 4771 bp의 DNA 절편을 분리하였다.

<122> hTPO 유도체의 cDNA PCR 산물과 이동벡터 pBlueBac4를 연결시키기 위하여 이들을 4 : 1의 몰비율로 혼합하고 T4 DNA 라이제이즈(NEB사, Cat. No. 202S)를 이용하여 16°C에서 16시간동안 반응시켰다. 이 반응액을 대장균 TOP10F'(Invitrogen사, Cat. No. C3030-03) 균주에 공지의 일렉트로포레이션 방법으로 형질전환시켜 대장균 형질전환체를 획득하였다. 형질전환체 클론을 LB(1 l 당 10g 트립تون, 5g 효모 추출물, 10g NaCl) 배지 50 ml에서 37°C로 18시간 배양한 후, 위자드 미디프렙(Wizard Midiprep) 키트(Promega사, Cat. No. A7640)를 이용하여 그로부터 이동벡터를 대량 추출하였다.

<123> 상기와 같은 과정으로 제조된 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 이동벡터를 각각 pBlue29, pBlue30, pBlue31, pBlue32, pBlue33, pBlue34, pBlue58, pBlue59, pBlue60, pBlue61, pBlue62, pBlue63이라고 명명하였다(도 2 참조).

<124> (2-2) 동물세포 발현벡터의 제조

<125> hTPO 유도체 유전자를 포함하는 재조합 동물세포 발현벡터를 제조하기 위해, 천연형 hTPO를 기준의 pCDNA3.1(Invitrogen사, Cat. No. 790-20) 벡터의 *Kpn*I과 *Eco*RI 부위에 삽입하여 제조한 pCDT 벡터를 이용하였다.

<126> 구체적으로 pCDT 벡터 DNA 5 μg을 제한효소 *Eco*RI과 *Nhe*I으로 3시간 동안 반응시킨 다음 1% 아가로오스 겔 전기영동을 수행하여 4958 bp의 DNA 절편

을 분리하였다. (2-1)에서 제조한 각 hTPO 유도체를 포함하는 이동벡터 5 μ g을 취하여 제한효소 *Eco*RI 및 *Nhe*I 으로 상기의 조건하에서 절단하고 1087 bp의 DNA 절편을 분리하였다.

<127> 상기 pCDT 벡터와 hTPO 유도체 cDNA 절편을 연결시키기 위하여 각각을 1 : 3의 몰비율로 혼합하고, T4 DNA 라이게이즈를 사용하여 16°C에서 18시간동안 반응시켰다. 이 반응액을 대장균 TOP10F'(Invitrogen사, Cat. No. C3030-03) 균주에 공지의 일렉트로포레이션 방법으로 형질전환시켜 대장균 형질전환체를 획득하였다(도 3 참조). 형질전환체 클론을 LB배지 50 ml에서 37°C로 18시간 배양한 후 위자드 미디프렙(Wizard Midiprep) 키트(Promega사, Cat. No. A7640)를 이용하여 발현벡터를 대량 추출하였다. 상기와 같은 과정으로 제조된 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 동물세포 발현벡터를 각각 p40429, p40430, p40431, p40432, p40433, p40434, p40458, p40459, p40460, p40461, p40462, p40463이라고 명명하였다(도 3 참조). 분리한 플라스미드 DNA는 제한 효소 *Nhe*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Bsu*36 I 으로 절단하여 유전자가 바르게 삽입되었는지를 확인하였으며, 상기 벡터내 변이된 DNA 부위는 제한효소 지도작성 및 염기 서열 분석을 통하여 확인하였다. DNA 전기 영동법(Sambrook et al., Molecular cloning - A laboratory manual, 2nd Ed., Cold spring harbor laboratory press (1987))에 따라 각 발현벡터를 정량하여 CHO/K-1 세포주의 형질전환에 사용하였다.

<128> (2-3) hTPO 유도체의 CHO 세포에서의 발현

<129> 동물세포의 형질전환 과정은 리포펙타민(lipofectamin; Gibco-BRL사, Cat. No. 18324012) 방법에 따라 실시하였다. 우선 CHO-S-SFM II 배지(Gibco-BRL사, Cat. No. 12052-098) 600 μ l에 각 플라스미드 DNA 12 μ g을 첨가한 후 리포펙타민 36 μ l 가 첨가된 CHO-S-SFM II 배지 600 μ l와 잘 섞어 30분간 실온에 방치하였다. 방치후 24시간 전에 6-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰로 접종된 CHO/K-1 세포(ATCC CCL-61) 를 CHO-S-SFM II 배지로 1회 세척 후 0.8 ml의 신선한 배지를 가하였다. 30분 경과 후 리포펙타민 및 DNA와 배지 혼합물을 200 μ l씩 6-웰 플레이트에 분주한 후 5 시간 동안 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다. 이후 10% FBS가 포함된 배양 배지 1 ml을 첨가한 후 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하고 10% FBS(Gibco-BRL사, Cat. No. 16000-036)가 첨가된 Ham F-12(Gibco-BRL사, Cat. No. 11059) 배지로 교체한 다음, 5% CO₂, 37°C 배양 조건으로 72시간 배양하여 일시적(transient) 발현액을 제조하였다.

<130> 그리고 10% FBS가 첨가된 Ham F-12 배지로 교체한 후 48시간이 경과한 후에 6-웰 플레이트 중 한 웰의 세포를 100 mm 디쉬로 옮겨 500 μ g/ml의 제오신(zeocin; Gibco-BRL사, Cat. No. R25001)이 포함된 배지하에서 7-10일 동안 배양하였다. 현미경으로 제오신 내성을 나타내는 콜로니가 형성된 것을 확인한 후, 클로닝 실린더(cloning cylinder; Bellco사, Cat. No. 2090-01010)를 이용하여 각 유도체 당 12개 이상의 콜로니를 분리하였다. hTPO의 ELISA 키트(R&D사, Cat. No. DTP00)를 이용하여 발현량을 비교하여 가장 높은 발현량을 나타내는 것을 각 유도체의 발

현균주로 선정하였다.

- <131> <실시예 3> 두 부위 이상의 아미노산이 치환된 hTPO 유도체 cDNA를 함유한 포유동물 세포 발현벡터의 제조 및 CHO 세포에서의 발현
- <132> hTPO cDNA 유전자 내에 두 부위 이상의 아미노산을 치환시킨 hTPO 유도체를 제조하기 위하여, 상기 실시예 2에서 제조한 hTPO 유도체 cDNA를 함유한 포유동물 세포 발현벡터들을 이용하였다.
- <133> 구체적으로 p40435의 경우, 발현벡터 p40429를 제한효소 *NheI*과 *BspMI*으로 절단하여 Arg¹¹⁷ → Asn¹¹⁷의 아미노산 치환 부위가 포함된 494 bp의 유전자 조각을 분리하였다. 그리고 발현벡터 p40431를 제한효소 *BspMI*과 *Bsu36I*으로 절단하여 Gly¹⁴⁷ → Asn¹⁴⁷의 아미노산 치환 부위가 포함된 355 bp의 유전자 조각을 분리하였다. 또한 hTPO cDNA 유전자가 클로닝되어있는 동물세포 발현벡터 pCDT를 제한효소 *NheI*과 *Bsu36I*으로 절단한 후, 상기의 두 유전자 조각과 연결하여 Arg¹¹⁷ → Asn¹¹⁷과 Gly¹⁴⁷ → Asn¹⁴⁷의 두 부위의 아미노산을 치환된 hTPO 유도체 cDNA를 함유하는 동물 세포 발현벡터 p40435를 제조하였다.
- <134> Arg¹¹⁷ → Asn¹¹⁷과 Arg¹⁶⁴ → Asn¹⁶⁴의 아미노산 치환을 포함하는 p40436은 앞서 p40429로부터 분리한 494 bp의 유전자 조각과 발현벡터 p40433를 제한효소

*Bsp*MI과 *Eco*RI으로 절단하여 분리한 Arg¹⁶⁴ → Asn¹⁶⁴을 포함하는 593 bp의 유전자 조각을 제한효소 *Nhe*I과 *Eco*RI으로 절단하여 분리한 동물 세포 발현벡터 pCDT와 연결하여 제조하였다.

<135> p40437, p40438, p40439의 경우도 상기와 마찬가지로 각각에 해당하는 2종의 발현벡터로부터 치환된 아미노산 부위를 포함하는 유전자 조각을 분리하여 동물 세포 발현벡터 pCDT에 클로닝하는 방법으로 제조되었다(표 3 참조).

<136> p40446, p40447, p40449의 경우는 각각에 해당되는 3종의 발현벡터로부터 치환된 아미노산 부위를 포함하는 유전자 조각을 분리하여 동물 세포 발현벡터 pCDT에 클로닝하는 방법으로 제조되었다(표 3 참조).

<137> 제조된 8종의 동물세포 발현벡터를 실시예 2에서와 같이 6-웰 플레이트에서 CHO/K-1 세포에 형질전환시켜 일시적 발현액을 얻었다. 그리고 실시예 2에서와 같이 제오신 내성을 가지는 발현 균주를 분리하였다.

<138> <실시예 4> hTP0 유도체의 시험관내 생물학적 활성 평가 : M-07e 세포증식 검정법

<139> 우선, hTP0 유도체 시료를 제조하기 위하여, 각 유도체의 발현균주를 셀 팩토리(cell factory; Nunc사, Cat. No. 170009)를 사용하여 10 ℓ 대량배양하였다. 10% FBS가 첨가된 Ham F-12 배지로 각 발현균주 세포를 5×10^4 세포/ml로 셀 팩토리에 계대한 후 72시간 경과후 PBS로 1회 씻어주고 엑셀 배지(ExCell; JRH사, Cat.

No. 14311-10L)로 교체하였다. 5% CO₂, 37°C에서 96시간 동안 배양한 후 배양 상등액을 얻은 다음, 펠리콘(pelicon) 농축기(Millipore사, Cat. No. 42PEL60)를 사용하여 1차 농축을 수행하고 미니탄(minitan) 농축기(Millipore사, Cat. No. 80EL004)를 사용하여 2차 농축을 수행하였다. 농축된 각 시료는 1×TNT 완충용액(10 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween20, pH 7.4)으로 4°C에서 30시간 동안 투석을 실시하고 마지막으로 울트라프리(Ultrafree; Millipore사, Cat. No. UFV2BGC10)로 3차 농축을 수행하였다. 얻어진 시료를 ELISA 키트로 3회 정량하여 생체내 시험에 사용하였다.

<140> 거핵세포성 백혈병 세포주(Megakaryocyte leukemia cell line) M-07e는 GM-CSF(100 u/ml), 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배양배지(Gibco-BRL사, Cat. No. 22400-089)로 유지하였다.

<141> 활성평가를 하기 위해서, 평가 배지(5% FBS, RPMI1640)를 제조한 다음 상기에서 배양된 세포를 원심분리하여 모으고 RPMI1640으로 3회 씻어낸 후, 최종 평가 배지로 8×10^4 세포/ml이 되도록 조정하여 T-75 플라스크에 부유시키고 5% CO₂ 배양

기에서 24시간 동안 배양한 후, 다시 세포를 모아서 1×10^5 세포/ml이 되도록 조정하여 96-웰 플레이트에 100 μ l씩 분주하였다. 표준물질(rhTPO, 25 μ g)을 RPMI1640으로 8가지 농도(100.0~0.78125 ng/ml)로 연속 희석하여 준비하였다. 대조물질은 CHO 세포 유래 천연형 hTPO를 사용하였고, 총 11종의 유도체 (40429 내지 40439)를

각 1.5625, 6.25, 25 ng/ml의 농도로 희석하여 준비한 후에 각 시료를 웨当局 100 μ l 씩 분주하여 최종부피를 200 μ l로 맞추고 5% CO₂ 배양기에 넣어 20시간동안 배양한 후에 1 μ Ci(37 kBq) ³H-티미딘을 첨가하고, 4시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 4시간이 경과한 후 배양기에서 실험용 플레이트를 꺼내어 유리섬유 필터가 장착된 세포수집기로 세포만을 수집하고 PBS를 사용하여 7회 씻어주었다.

<142> 세포가 수집된 필터를 측정 바이알에 순서대로 넣고 액체 섬광 계수기(Liquid scintillation counter)로 ³H-방사능(³H-radioactivity)을 측정하고, 리아스마트(Riasmart) 소프트웨어를 사용하여 표준물질, 대조물질과 시료의 최고농도의 증가치(Half-maximal) 농도를 계산하여 각 농도에서의 활성을 비교 측정하였다.

<143> 각 농도에서의 M-07e 세포 증식 촉진 활성은 유도체간에 거의 같은 양상을 나타내었으며, 천연형 hTPO와 비교하여 동등이상의 활성을 나타낸 것은 25 ng/ml의 농도에서 40429, 40430, 40432, 40433, 40434, 40437, 40438, 40439의 8종이었다. 각각의 생물학적 활성은 천연형 hTPO의 역가를 100으로 보았을 때 117, 135, 120, 131, 97, 121, 166, 133%의 증감을 나타내었다(도 4 참조).

<144> <실시예 5> CHO 세포에서 발현된 hTPO 유도체의 생체내 활성

<145> 생체내 활성시험은 동물세포에서 발현된 hTPO 유도체를 투여한 마우스로부터

의 혈소판수를 측정하는 방법으로 수행되었으며, 그 결과를 도 6, 도 7a 및 도 7b에 나타내었다. 동물은 8주령의 암컷 Balb/c 마우스를 7주령으로 구입하여(Charles River사, 일본) 항온($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$), 항습(55%), 조명시간 12시간(오전 7시-오후 7시)에 설정된 대웅제약 중앙연구소 동물실에서 1주간 정도 사육 순화후 사용하였다. 시험기간 중에도 동물은 동일 사육실에서 사육하였다.

<146> 1군에 5마리가 되도록 체중을 지표로 한 충별 무작위 추출에 의해 마우스를 군분리하고, 각각 배양배지 투여군, 천연형 트롬보포에틴 투여군, 각 유도체 투여군 및 약제를 투여하지 않는 무처리군으로 설정하였다.

<147> hTP0 유도체는 $36 \mu\text{g}/\text{kg}$ 또는 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 의 일정한 농도로 단회 피하투여 하였고, 채혈은 투여시작일을 0일째로 하여 10일차까지 매일 시행하였으며, 채혈 전 일의 투여로부터 24시간 이내에 행하였다. 에테르 마취하에 마우스의 복부하대정맥으로부터 전혈을 채취하고 EDTA 처리 투브에 옮긴 다음 말초혈중의 혈소판 수를 자동 혈구계측기(Cell dyn 3500, 에보트사)를 사용하여 측정하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다.

<148> 천연형 hTP0는 혈소판수의 증가를 자극하여 3일차부터 증가하기 시작하여 5일차에 최대 혈소판수를 나타내었으며, 10일차에는 정상수준으로 회복되었다. 처리한 모든 유도체는 혈소판수의 증가를 자극하였으며, 그 중 40433, 40434, 40449, 40458 유도체들은 천연형 hTP0에 비해 동등이상의 활성을 나타내었다. 특히 40433 유도체의 경우, 생체내 혈소판 생성활성이 투여후 5일째에 천연형 hTP0보다 유의하게 약 34% 이상 그리고 전체적으로는 80% 이상 현저히 향상된 결과를 보였다.

<149> <비교예 1> 천연형 hTPO의 생체내(*in vivo*) 활성

<150> 동물세포에서 유래한 천연형 hTPO를 처리한 마우스로부터 혈소판수를 측정하여 도 5에 나타내었다. 동물은 8주령의 암컷 Balb/c 마우스를 7주령으로 구입하여(Charles River사, 일본) 항온($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$), 항습(55%), 조명시간 12시간(오전 7시-오후 7시)에 설정된 대웅제약 중앙연구소 동물실에서 1주간 정도 사육 순화 후 사용하였다. 시험기간 중에도 동물은 동일 사육실에서 사육하였다.

<151> 1군에 5마리가 되도록 체중을 지표로 한 층별 무작위 추출에 의해 마우스를 군분리하고, 각각 배양배지 투여군, 천연형 트롬보포에틴 투여군 및 약제를 투여하지 않는 무처리군으로 설정하였다. 천연형 hTPO는 각각 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로 단회 피하투여하였으며, 채혈은 투여 시작일을 1일째로 하여 4일차, 8일차, 10일차에 시행하고 채혈 전일의 투여로부터 24시간 이내에 행하였다. 에테르 마취하에 마우스의 복부하대정맥으로부터 전혈을 채취하고 EDTA 처리 투브에 옮긴 다음 말초혈증의 혈소판 수를 자동 혈구계측기(Cell dyn 3500, 에보트사)를 사용하여 측정하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 천연형 hTPO는 혈소판수의 증가를 자극하였으며 4일차에 증가하기 시작하여 8일차에 최대 혈소판수를 나타내었고, 10일차에는 약 20% 감소하였다.

<152> <실시예 6> hTPO 유도체 cDNA를 함유한 포유동물세포 dhfr 증폭발현벡터의 제조 및 발현 세포주의 선정

<153> (6-1) hTPO 유도체의 cDNA를 포함하는 dhfr 증폭발현벡터의 제조

<154> 실시예 5에서의 결과로부터 40433, 40434, 40449, 40458의 4종의 유도체에 대해 dhfr 증폭발현벡터를 제조하였다.

<155> 먼저, dhfr 유전자를 포함하는 벡터 pSV2-dhfr (수탁번호 : ATCC 37146)에 *Bam*HI 링커 (linker)를 삽입하였다. *Bam*HI 링커는 서열 27와 서열 28의 오리고뉴클레오타이드를 각각 인산화시킨후, 어닐링 (annealing)하여 사용하였다. 구체적으로 T4 키나아제 (T4 polynucleotide kinase, NEB사, Cat. No. 201S)를 사용하여 37℃에서 3시간동안 반응시켜 각 오리고뉴클레오타이드를 인산화시킨후, 동량의 각 오리고뉴클레오타이드를 섞어준 다음 94℃에서 2분간 방치한 후 65℃에서 37℃까지 30초당 0.2℃씩 온도가 내려가도록 반응시키는 방법으로 어닐링을 수행하였다. 벡터 pSV2-dhfr을 제한효소 *Pvu*II와 *Sph*I으로 절단한 후, 준비된 *Bam*HI 링커와 연결시켰다. 이렇게 얻은 벡터를 제한효소 *Bam*HI으로 절단하여 dhfr 유전자를 포함하는 1710 bp의 유전자 절편을 분리하였다.

<156> 천연형 hTPO 유전자를 포함하는 발현벡터 pCDT를 제한효소 *Bgl*II로 절단한 후, 앞서 얻은 dhfr 유전자를 포함하는 1710 bp의 유전자 절편을 삽입하였다. 이렇게 얻은 천연형 hTPO 유전자를 포함하는 dhfr 증폭발현벡터를 pDCT라 명명하였다 (도 8 참조).

<157> 5종의 유도체에 대한 dhfr 증폭발현벡터를 제조하기 위해 서열 29의 오리고뉴클레오타이드와 서열 2의 오리고뉴클레오타이드를 시발체로 하여 각 유도체의 유전자를 실시예 1에서와 같은 조건으로 증폭하였다. 증폭된 유전자를 제한효소 *Kpn*I

과 *EcoRI*으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단한 dhfr 증폭발현벡터 pDCT와 연결시켰다. 완성된 각 유도체의 유전자를 포함하는 dhfr 증폭발현벡터들을 각각 pD40433, pD40434, pD40449, pD40458이라 명명하였다.

<158> (6-2) CHO/dhfr(-) 세포주로의 형질전환과 유전자 증폭

<159> 각 유도체의 유전자를 포함하는 dhfr 증폭발현벡터들을 실시예 2에서와 같이 리포펙타민 방법으로 동물세포 CHO/dhfr(-)(ATCC CRL-9096)에 형질전환시켰다. 이 때 형질전환에는 IMDM 배지 (Gibco-BRL사, Cat. No. 12200-036)를 사용하였고, 배양시에는 10% 투석된 FBS (Gibco-BRL사, Cat. No. 26300-061)가 포함된 IMDM 배지를 사용하였다.

<160> 형질전환된 세포주를 선별하기 위해, 형질전환후 48시간이 경과한 다음 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 1×10^3 세포수로 계대한 후, 500 μ g/ml의 제오신이 포함된 배지하에서 10-14일동안 배양하였다. 제오신 내성을 나타내는 콜로니를 분리한 후, ELISA 정량을 통해 발현량이 높은 세포주를 10-20개씩 선정하였다.

<161> 선정된 각 세포주를 20nM MTX (Methotrexate, Sigma사, Cat. No. M8407)가 포함된 배양배지하에서 계대하면서 유전자 증폭을 수행하였다. 구체적으로 T-25 플라스크에서 세포가 가득찰 때까지 키운 후, 세포수를 1/5, 1/10, 1/15로 줄여가면서 계대하여 최종 1/15의 세포수로 계대한 후 3-4일후에 T-25 플라스크가 세포로 가득차게 되면 증폭을 완료하였다. 각 유도체에 대해 20nM MTX가 포함된 배양배지

로 증폭된 세포주들 중 ELISA 정량 결과 발현량이 가장 높은 것을 발현세포주로 선정하여, 생체내 활성 평가를 위한 정제시료 생산에 사용하였다.

<162> <실시예 7> CHO/dhfr(-) 세포에서의 천연형 hTPO 및 hTPO 유도체의 발현 및 정제

<163> 우선, 천연형 hTPO 및 hTPO 유도체 시료를 제조하기 위하여, 실시예 6에서 제조된 천연형 및 각 유도체의 발현균주를 셀 팩토리 (cell factory; Nunc사, Cat. No. 170069)를 사용하여 4 리터 대량배양하였다. 10% FBS가 첨가된 IMDM 배지로 각 발현균주 세포를 5×10^4 세포/ml로 셀 팩토리에 계대하고 72시간 경과 후 PBS로 1회 씻어주고 DMEM/Ham F-12 배지로 교체하였다. 5% CO₂, 37°C에서 96시간동안 배양한 후 배양 상등액을 얻은 다음 정제 과정에 들어갔다.

<164> CM Affi-Gel 블루 레진 (Bio-Rad사; Cat. No. 153-7304) 50 ml을 XK26/20 칼럼 (Amersham-pharmacia사; Cat. No. 18-1000-72)에 충진 후 완충액 A (10 mM 인산나트륨, 150 mM 염화나트륨, pH 7.4)로 하룻밤동안 충분히 씻어주었다. 위에서 얻은 배양 상등액 4 리터를 5 ml/min의 속도로 칼럼을 통과하게 하였고, 280 nm에서 UV로 모니터링하였다. 배양 상등액을 다 흘린 다음 완충액 B (10 mM 인산나트륨, 2M 요소, pH 7.4)로 UV 수치가 기저 수준이 될 때까지 씻어준 다음 완충액 C (10 mM 인산나트륨, 2M 요소, 1M 염화나트륨, pH 7.4)로 TPO를 포함한 레진에 붙은 단백질들을 용출시킨 후 이 분획을 모아서 다음 단계인 페닐세파로즈 칼럼 크로마토그래피에 적용하였다. 페닐세파로즈 CL4B 레진 (Sigma사; Cat. No. P7892) 50 ml을 XK26/20

칼럼에 충진후 완충액 C로 하룻밤동안 충분히 씻어주었다. CM Affi-Gel 블루 단계에서 얻은 용출분획을 3 ml/min의 속도로 칼럼에 적용하였고 280 nm에서 UV로 모니터링하였다. 분획을 다 흘린 다음 완충액 C로 UV 수치가 기저 수준이 될 때까지 씻어준 다음 완충액 B로 TPO를 포함한 레진에 붙은 단백질들을 용출시킨후 이 분획을 모아서 다음 단계인 히드록실아파티트 칼럼 크로마토그래피 (hydroxylapatite column chromatography)에 적용하였다. 히드록실아파티트 레진 (Bio-Rad사; Cat. No. 130-0420) 10 ml을 XK16/20 칼럼 (Amersham-pharmacia사; Cat. No. 18-8773-01)에 충진후 완충액 D (10 mM 인산나트륨, 2M 요소, pH 6.8)로 하룻밤동안 충분히 씻어주었다. 페닐세파로즈 단계에서 얻은 용출 분획을 5 N HCl로 pH 6.8로 조정한 후 1 ml/min의 속도로 적용하였다. 이 단계에서는 TPO는 레진에 붙지 않고 흘러 나오고 불순 단백질만 레진에 붙기 때문에 흘러나오는 분획을 모았다. 완충액 D로 UV 수치가 기저 수준이 될 때까지 씻어준 다음 완충액 E (0.5 M 인산나트륨, 2M 요소, pH 6.8)로 레진에 붙어 있는 불순 단백질들을 용출시켰다. 히드록실아파티트 단계에서 얻은 TPO 분획을 농축시키기 위하여 이코노팩 Q 카트리지 (Econo-Pac Q cartridge, Bio-Rad사; Cat. No. 732-0021)를 이용하여 10 ml의 부피로 농축한 후 염분 및 요소 성분을 제거하기 위하여 10 mM 인산나트륨 완충액으로 24시간동안 투석하였다. hTPO 유도체의 각 정제과정의 산물은 SDS-PAGE와 실버 스테이닝으로 확인하였다 (도 9 참조). 염색법은 실버 스테인 플러스 키트 (Bio-Rad사, Cat. No. 161-0449)를 사용하여 제조사의 실험법에 따라 수행하였다.

kg의 농도에서 생체내 활성시험을 수행하였다. 처리한 모든 유도체는 혈소판 수의 증가를 자극하였을 뿐만아니라 천연형 hTPO에 비해 증강된 활성을 나타내었다. 구체적으로 투여후 1일째부터 10일째까지 전체적으로 천연형 hTPO에 비해 40433 유도체는 77%, 40434 유도체는 91%, 40449 유도체는 26%, 40458 유도체는 79% 의 활성 증가를 나타내었다 (도 10 참조).

<166> <실시예 8> hTPO 유도체의 특성분석 : 당쇄 도입여부 확인 및 안정성 분석

<167> hTPO 유도체에 당쇄가 도입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블럿 분석을 실시하여 hTPO 유도체의 띠가 천연형 TPO의 띠보다 더 무거운 쪽에 나타나는지의 여부를 확인하였다.

<168> 10~20% 구배 트리신 폴리아크릴아마이드 젤 (10~20% gradient tricine polyacrylamide gel, Novex사; Cat. No. EC66252)에 정제된 천연형 TPO 및 hTPO 유도체를 로딩하고 10 V/cm로 전기영동시켰다. 이 젤을 니트로셀룰로즈 필터에 흡착시켰다. 필터를 1시간동안 5% 탈지분유를 포함한 TBS 용액 (pH 7.5)에 처리한 다음 염소의 항인간 TPO 폴리클로날 항체 (R&D system사)를 1 : 1000의 비율로 희석하여 18시간동안 반응시켰다. 그 후 2차 항체로서 알칼라인 포스파타제 - 항 염소 IgG 콘쥬게이트 (alkaline phosphatase-conjugated anti-goat IgG, Sigma사)를 1 : 10000의 비율로 희석하여 2시간동안 처리하고 발색기질인 BCIP/NBT (Sigma) 용액을 부가하여 발색시켰다. 그 결과 hTPO 유도체들의 분자량이 도입된 당쇄수에 비례적으로 천연형 hTPO에 비해 증가됨을 확인하였다 (도 11 참조).

<169>

hTPO 유도체의 안정성 여부를 확인하기 위하여 천연형 hTPO와 hTPO 유도체 중 40433 유도체에 트롬빈을 처리하여 시간변화에 따라 단백질 띠의 크기가 감소되는 양상을 관찰하였다. hTPO 유도체 ($50 \mu\text{g/ml}$)에 트롬빈 (5 units/ml; Sigma사)을 처리한 후 37°C 에서 0.5, 1, 2, 3, 4, 6시간동안 반응시킨 후 위에 적은 방법과 동일하게 SDS-PAGE와 웨스턴 블럿 분석을 실시하여 단백질이 잘려나가는 양상을 관찰하였다. 천연형 hTPO는 트롬빈 처리 30분 이후부터 현저하게 잘려나가는 반면, 40433 유도체는 트롬빈 처리 4시간 이후부터 잘려나가기 시작했다 (도 12 참조). 즉 이것은 천연형 hTPO에 비해 40433 유도체가 더욱 안정하다는 것을 나타내며, 그 것은 도입된 당쇄에 기인한다고 볼 수 있다.

【발명의 효과】

<170>

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 hTPO 유도체는 생체내에서 혈소판 전구세포의 증식을 유도하고 혈소판 증식의 효능이 매우 향상된 hTPO 유도체로서 항암치료나 골수이식에 따른 혈소판 감소증의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 hTPO 유도체 중 40433, 40434, 40449, 40458 등은 천연형보다 혈소판 생성 효능이 유의적으로 매우 향상된 결과를 보이는 것으로 다음과 같은 잇점을 제공한다. 즉, 투여 용량을 낮추어서 투여한 경우에도 천연형과 유사한 효능을 보임으로 혈소판 감소증 환자들에게 투여용량 및 투여횟수를 감소시켜 환자 치료비용을 경감시키고 환자의 복지를 향상시켜 주며 적은 양의 투여로 인한 불순단백질의 유입이 극소화됨으로써 물질의 안전성을 증대시킬 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열 30에 의해 기재되는 천연형 인간 트롬보포이에틴 (hTPO)의 유도체로서, N-연결형 당쇄가 도입되었고, $[Asn^{108}]$ hTPO, $[Asn^{117}]$ hTPO, $[Asn^{147}]$ hTPO, $[Asn^{153}]$ hTPO, $[Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{193}]$ hTPO, $[Asn^{117}, Asn^{147}]$ hTPO, $[Asn^{117}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{108}, Asn^{147}]$ hTPO, $[Asn^{108}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{147}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{117}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{147}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{108}, Asn^{147}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{108}, Asn^{117}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{157}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{162}, Ser^{164}]$ hTPO, $[Asn^{162}, Thr^{164}]$ hTPO, $[Asn^{153}, Ser^{155}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{153}, Thr^{155}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{159}, Ser^{161}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{159}, Thr^{161}, Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{166}, Ser^{168}]$ hTPO, $[Asn^{166}, Thr^{168}]$ hTPO, 및 $[Asn^{164}, Asn^{168}]$ hTPO로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 인간 트롬보포이에틴 유도체.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, $[Asn^{164}]$ hTPO, $[Asn^{193}]$ hTPO, $[Asn^{108}, Asn^{117}, Asn^{164}]$ hTPO 또는 $[Asn^{157}, Asn^{164}]$ hTPO인 것을 특징으로 하는 인간 트롬보포이에틴 유도체.

【청구항 3】

제 1항의 인간 트롬보포이에틴 유도체를 암호화하는 재조합 인간 트롬보포이에틴 유전자.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 인간 트롬보포이에틴 유도체는 제 2항의 인간 트롬보포이에틴 유도체인 것을 특징으로 하는 재조합 인간 트롬보포이에틴 유전자.

【청구항 5】

제 3항의 유전자를 포함하는 진핵세포용 발현벡터.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, p40433, p40434, p40449, p40458, pD40433, pD40434, pD40449 또는 pD40458 인 것을 특징으로 하는 진핵세포용 발현벡터.

【청구항 7】

제 6항의 발현벡터 p40433 으로 형질전환된 포유동물 세포주 CHO K-1/p40433 (KCTC 0495BP).

【청구항 8】

제 6항의 발현벡터 pD40434 으로 형질전환된 포유동물 세포주 CHO dhfr-/pD40434 (KCTC 0630BP).

【청구항 9】

제 6항의 발현벡터 pD40449 으로 형질전환된 포유동물 세포주 CHO dhfr-/pD40449 (KCTC 0631BP).

【청구항 10】

제 6항의 발현벡터 pD40458 으로 형질전환된 포유동물 세포주 CHO dhfr-/pD40458 (KCTC 0632BP).

【청구항 11】

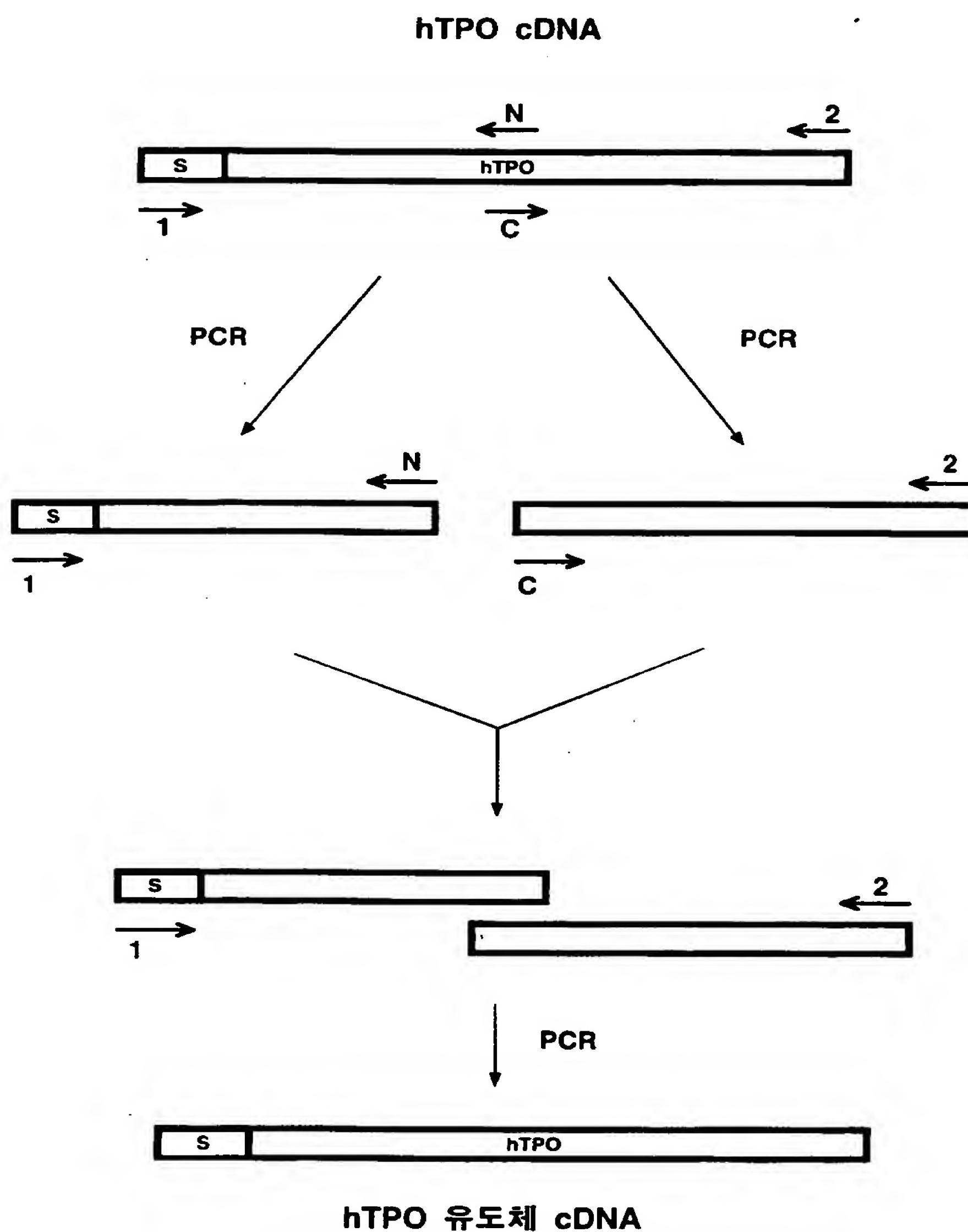
제 3항의 재조합 인간 트롬보포이에틴 유전자를 포함하는 포유동물 세포주를 배양하여 인간 트롬보포이에틴 유도체를 얻는 것을 특징으로 하는 제 1항의 인간 트롬보포이에틴 유도체의 제조방법.

【청구항 12】

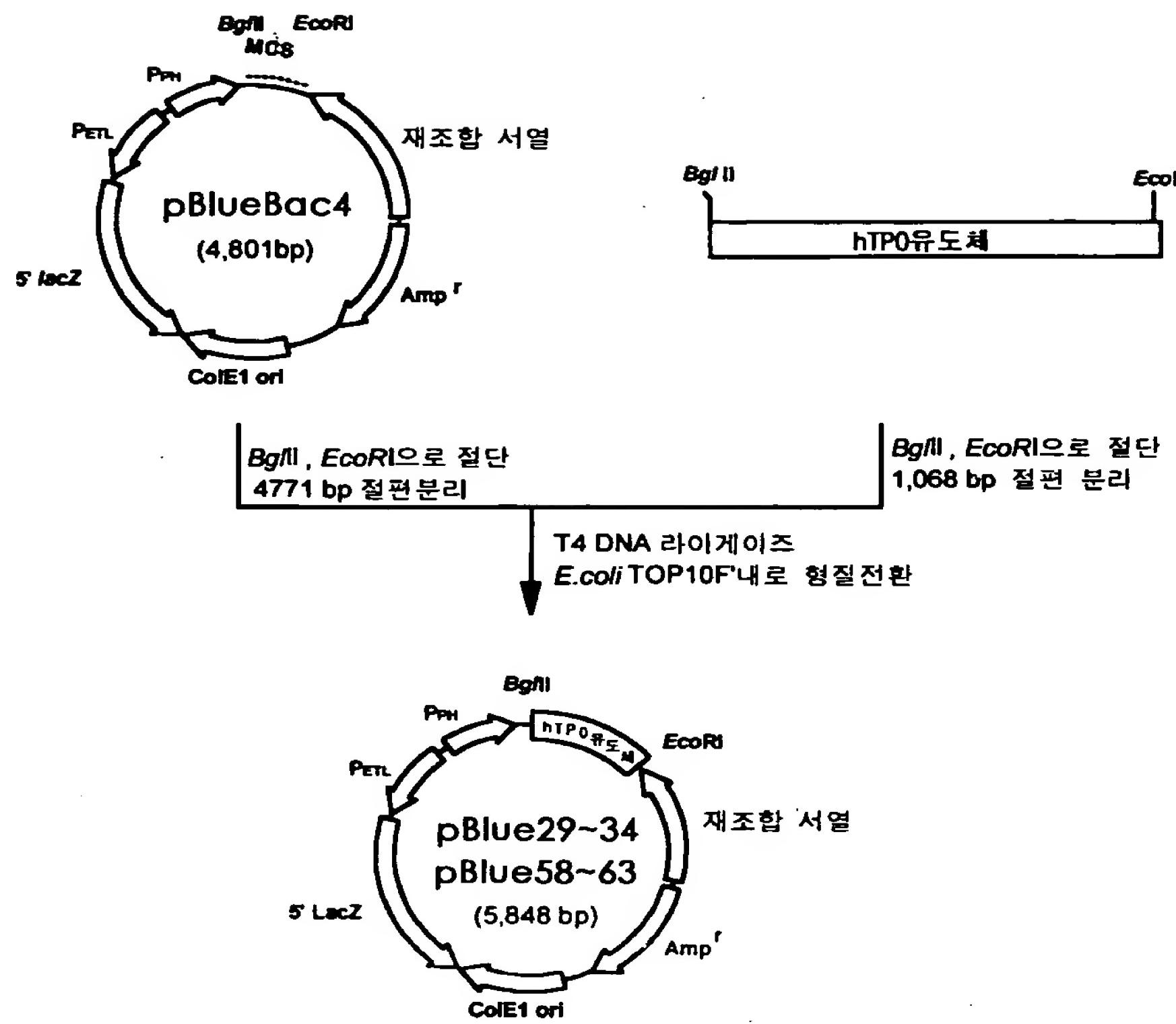
제 1항의 인간 트롬보포이에틴 유도체를 유효성분으로 하는 혈소판 감소증 치료제.

【도면】

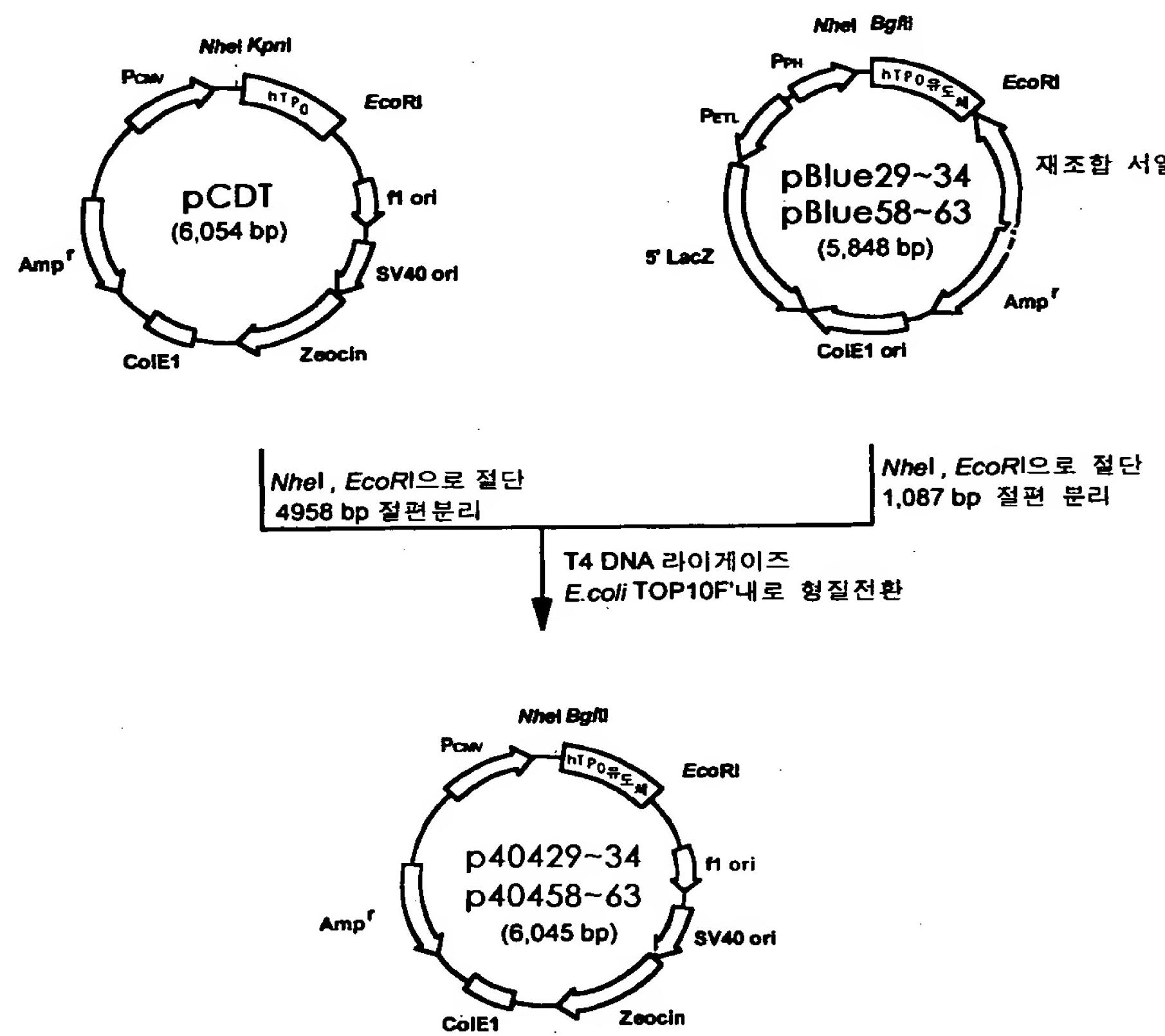
【도 1】



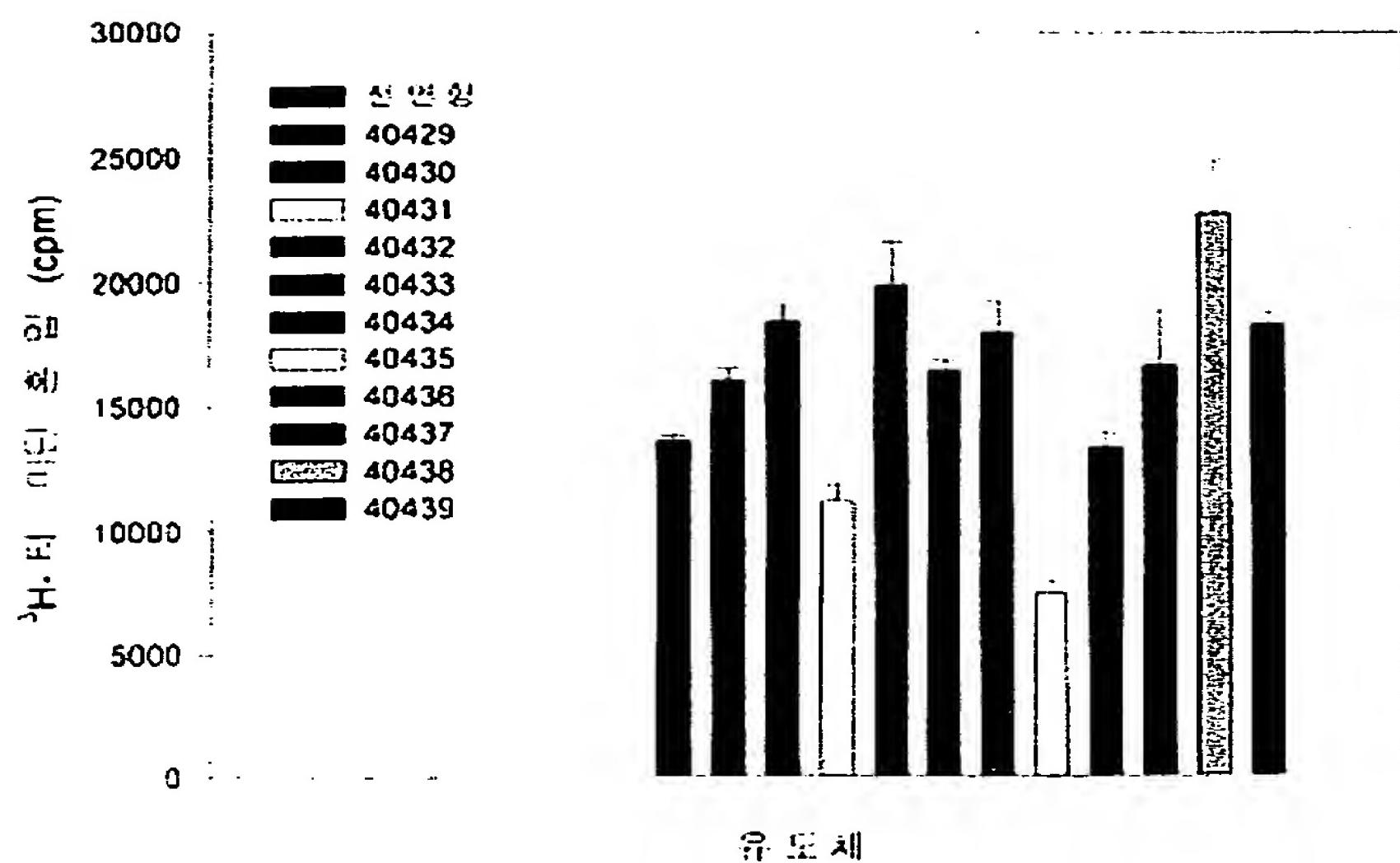
【도 2】



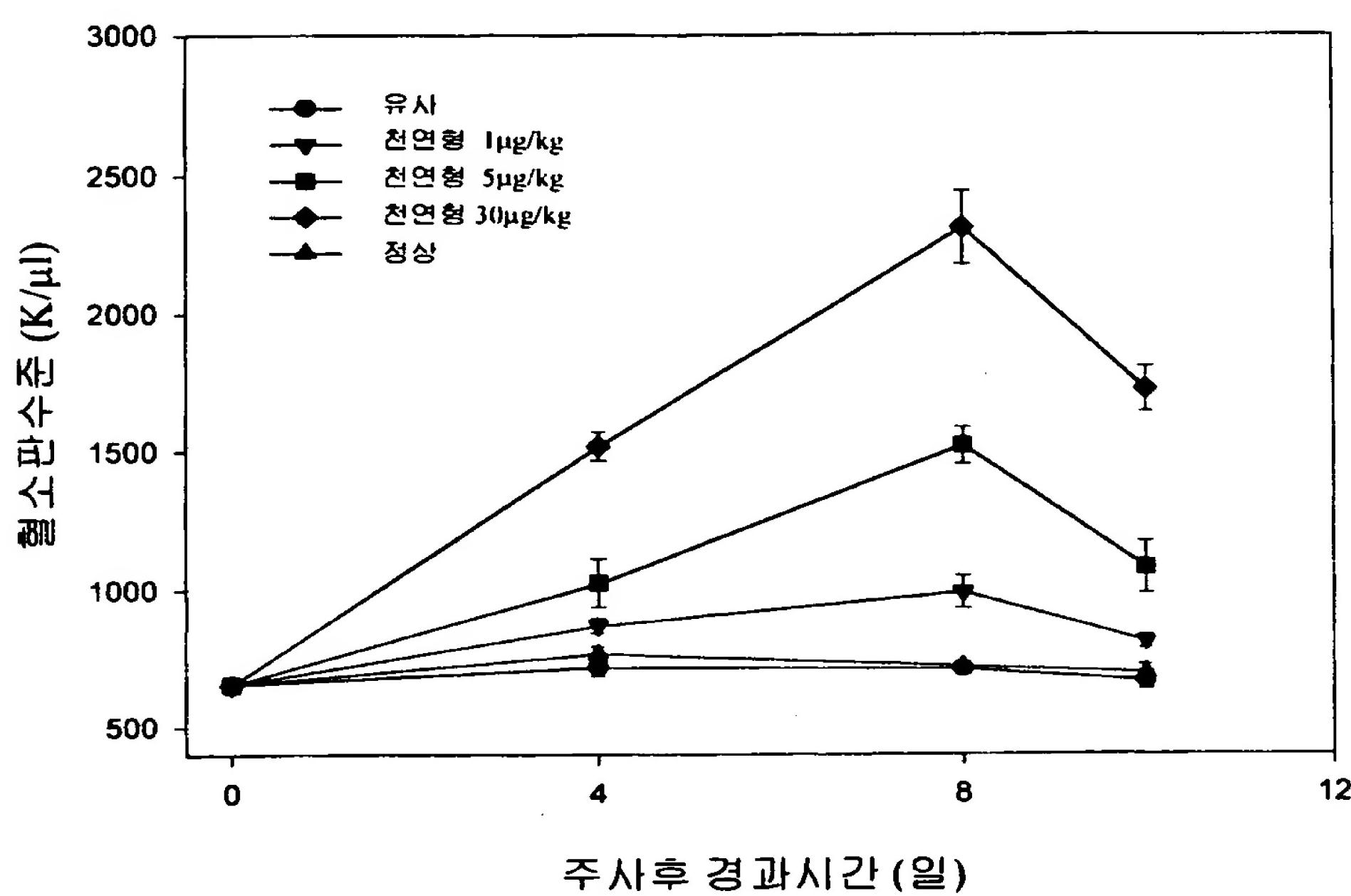
【도 3】



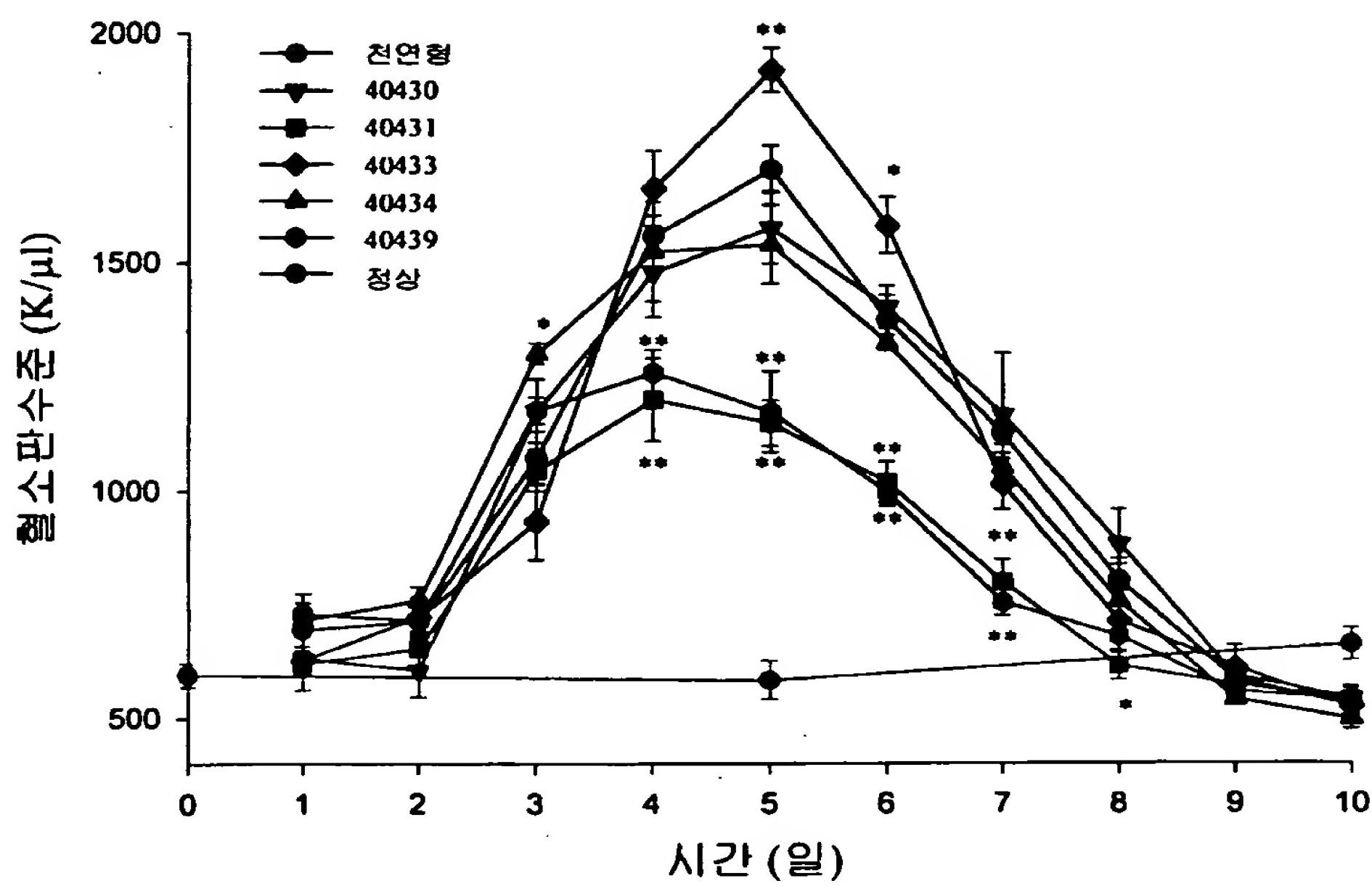
【도 4】



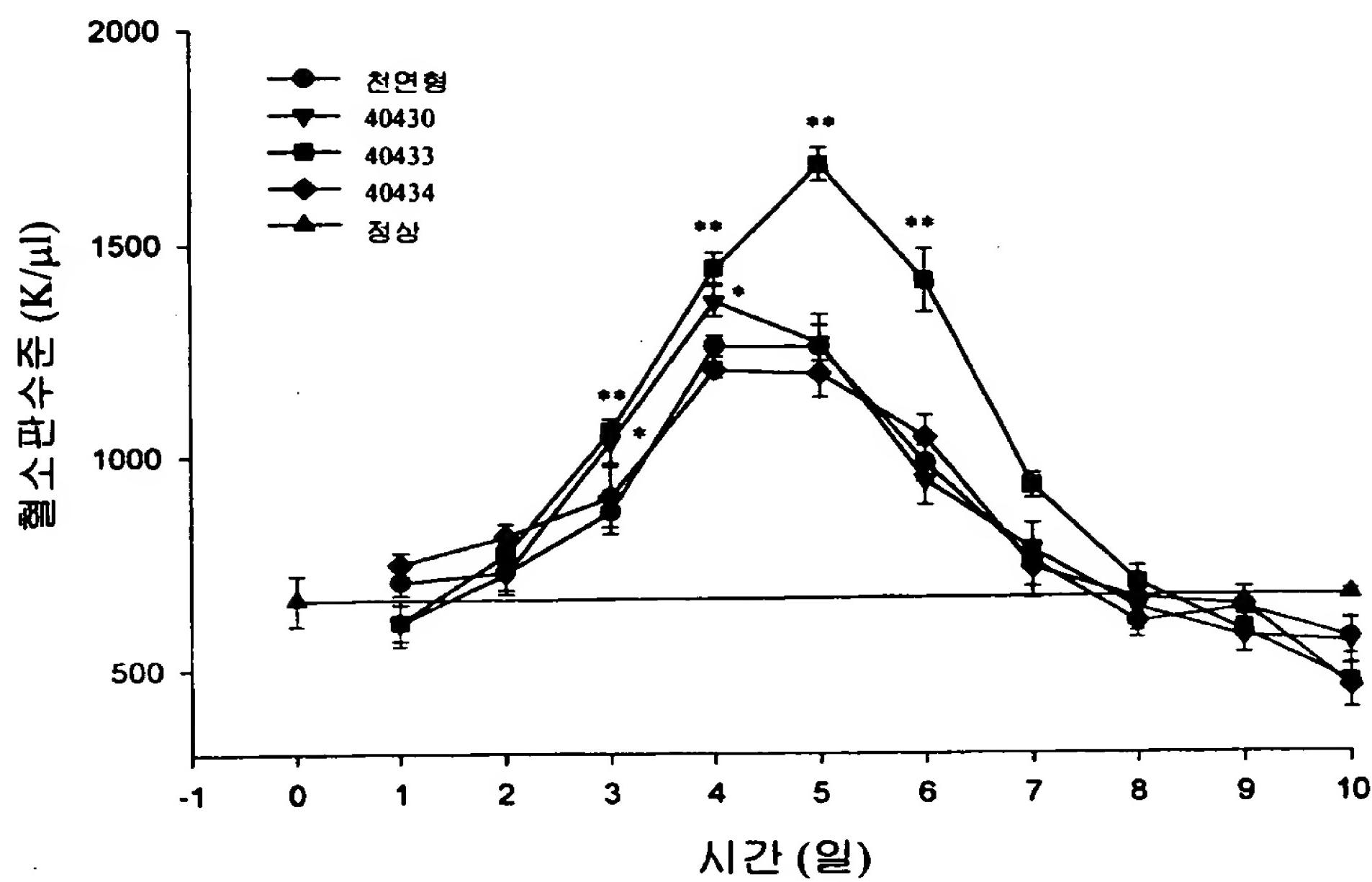
【도 5】



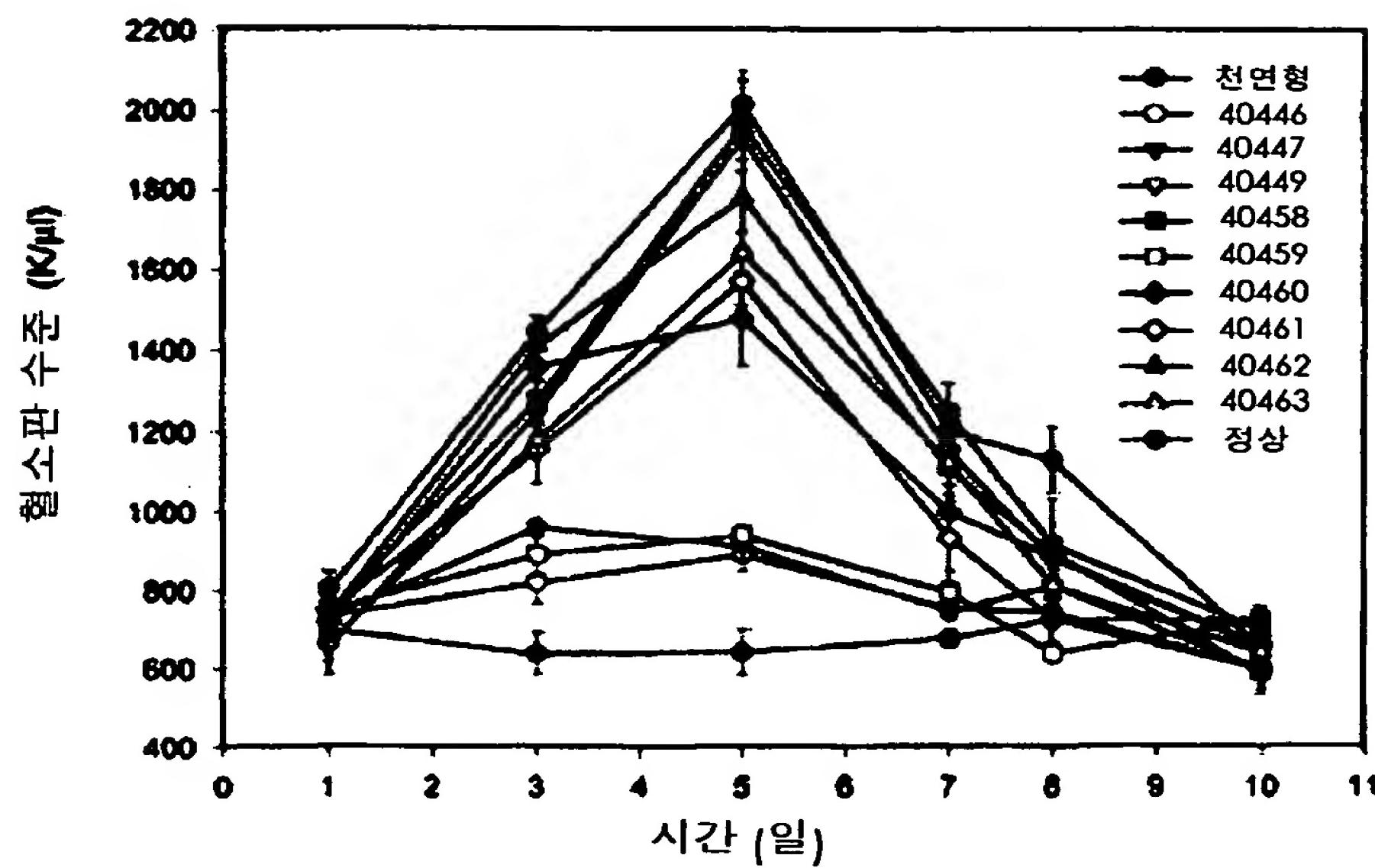
【도 6】



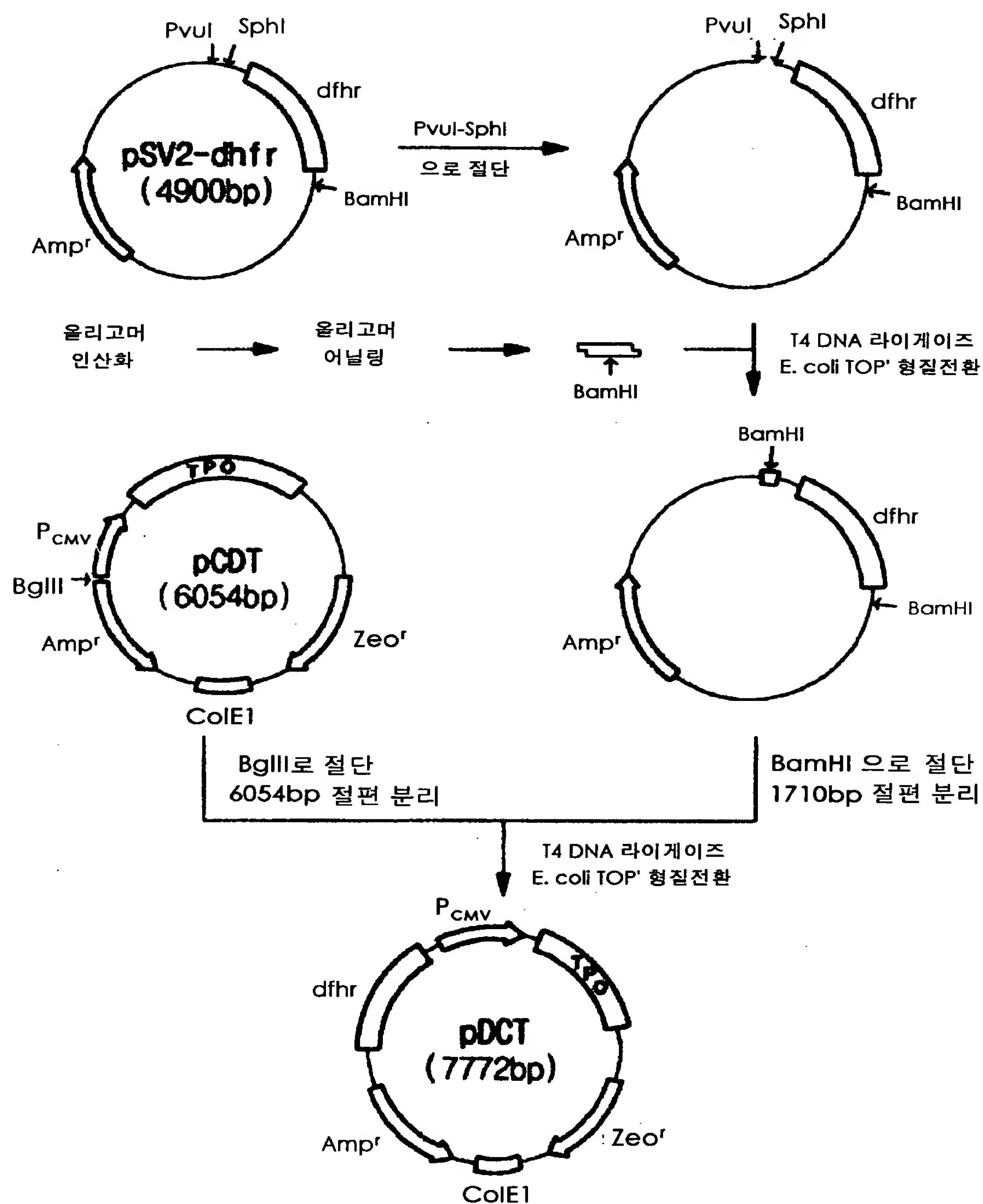
【도 7a】



【도 7b】

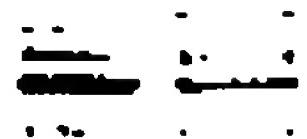


【도 8】

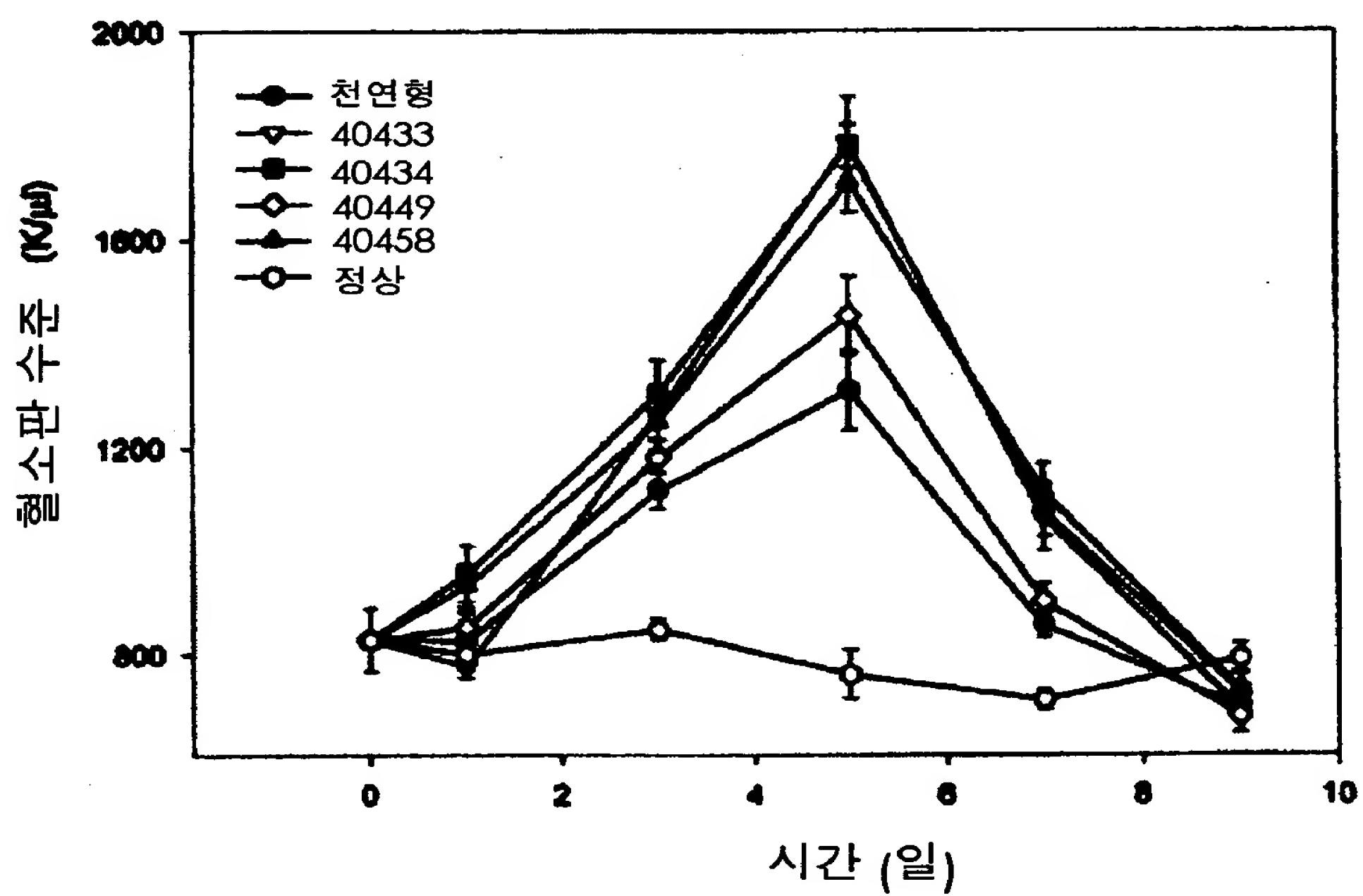


【도 9】

M 1 2 3 4 5



【도 10】



【도 11】

M 1 2 3 4 5



【도 12a】

M 1 2 3 4 5 6 7

【도 12b】

M 1 2 3 4 5 6 7

【서열목록】

<110> Dae Woong Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> A novel human thrombopoietin mutein

<130> 9p-06-37

<150> KR 98-25935

<151> 1998-06-30

<160> 34

<170> KOPATIN 1.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BgIII-tagged primer corresponding to the N terminal sequence of hTPO protein

<400> 1
gaagatctat ggagctgact gaa 23

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EcoRI-tagged primer corresponding to the C terminal sequence of hTPO protein

<400> 2
atgaattctc accttccctg agac 24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligodeoxynucleotide primer 29-N

<400> 3
gctgtggtgt tgccctgtgg 20

<210> 4

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligodeoxynucleotide primer, 29-C

<400> 4
acaggcAAC accacagCTC 20

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligodeoxynucleotide primer, 30-N

<400> 5
gggttccgtt taaactctgc ag 22

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligodeoxynucleotide primer 30-C

<400> 6
ctgcagAGTT taaacggAAC ccag 24

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 31-N

<400> 7
agagggtgga attccctaca agca 24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 31-C

<400> 8
tgctttagg gaattccacc ctct 24

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 32-N

<400> 9
gggcccggtt gacgcaga 18

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 32-C

<400> 10
tctgcgtcaa ccggggccc 18

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 33-N

<400> 11
ggactagaga cgttgtctg gggac 25

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 33-C

<400> 12

gtccccagca acacgtctct agtcc

25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 34-N

<400> 13

gaagcccaga tccgttagtt ctggc

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 34-C

<400> 14

gccagaacta acggatctgg gcttc

25

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 58-N

<400> 15

agctgtggtg tttggggccc gc

22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 58-C

<400> 16

gcgggccccca aacaccacag ct

22

<210> 17

<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer 59-N	
<400>	17	
	ctagagaggt gctgttgaca gctgtg	26
<210>	18	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer 59-C	
<400>	18	
	cacagctgtc aacagcagca cctctctag	29
<210>	19	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer 60-N	
<400>	19	
	ggtgtgggtggg gtccgggtga cgtagagg	28
<210>	20	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer 60-C	
<400>	20	
	cctctgcgtc aaccggaccc cacccacc	28
<210>	21	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220>
<223> primer 61-N

<400> 21
tctgctgggg gaagcgttgg tgggtgg 27

<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 61-C

<400> 22
ccacccacca acgcttcccc cagcaga 27

<210> 23
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 62-N

<400> 23
cagtgtgagg gtttagattgg ttctgctg 28

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 62-C

<400> 24
cagcagaacc aatctaacc tcacactg 28

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 63-N

<400> 25

cagtgtgagg tttagagagg tt 22

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 63-C

<400> 26
aacctctcta aacacctcacac tg 22

<210> 27
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligodeoxynucleotide 1 of BamHI linker

<400> 27
cgcgatccg catg 14

<210> 28
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligodeoxynucleotide 2 of BamHI linker

<400> 28
cggatccgcg 10

<210> 29
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KpnI-tagged primer corresponding to the N terminal sequence of hTPO protein

<400> 29
ggggtaaccgc caccatggag ctgactgaat tg 32

<210> 30

<211> 332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
1 5 10 15

Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
20 25 30

His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
35 40 45

Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
50 55 60

Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
65 70 75 80

Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
85 90 95

Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
100 105 110

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
115 120 125

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
130 135 140

Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
145 150 155 160

Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn
165 170 175

Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr
180 185 190

Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile
195 200 205

Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly
210 215 220

Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe
225 230 235 240

Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly
245 250 255

Thr	Ser	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser
							260			265				270	
Pro	Ser	Pro	Thr	His	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu
							275			280				285	
Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Leu	Pro	Val	Val	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Pro
							290			295				300	
Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Leu	Leu	Asn	Thr	
							305			310			315		320
Ser	Tyr	Thr	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Gly				
							325			330					
<210> 31															
<211> 996															
<212> DNA															
<213> Artificial Sequence															
<220>															
<223> cDNA sequence encoding hTPO mutein 40433															
<400> 31															
agcccggttc	ctcctgcttg	tgacctccga	gtcctcagta	aactgcttcg	tgactccat		60								
gtccttcaca	gcagactgag	ccagtgccta	gaggttcacc	cttgcctac	acctgtcctg		120								
ctgcctgctg	tggacttag	cttggggagaa	tggaaaaccc	agatggagga	gaccaaggca		180								
caggacattc	tgggagcagt	gaccctctg	ctggagggag	tgtatggcagc	acggggacaa		240								
ctgggaccca	cttgcctctc	atccctcctg	ggcagctt	ctggacaggt	ccgtctcctc		300								
cttggggccc	tgcagaggct	ccttggAACCC	cagcttcctc	cacagggcag	gaccacagct		360								
cacaaggatc	ccaatgccat	cttcctgagc	ttccaacacc	tgctccgagg	aaaggtgcgt		420								
ttcctgatgc	ttgttaggagg	gtccaccctc	tgcgtcaggc	gggccccacc	caccacagct		480								
gtccccagca	acacgtctct	agtccctaca	ctgaacgagc	tcccaaacag	gacttctgga		540								
tttgtggaga	caaacttcac	tgcctcagcc	agaactactg	gctctggct	tctgaagtgg		600								
cagcagggat	tca gagccaa	gattcctgg	ctgctgaacc	aaacctccag	gtccctggac		660								
caa atccccg	gatacctgaa	caggatacac	gaactcttga	atggaactcg	tggactctt		720								
cctggaccct	cacgcaggac	cctaggagcc	ccggacattt	cctcaggaac	atcagacaca		780								

ggctccctgc	cacccaacct	ccagcctgga	tatttcctt	ccccaaacca	tcctcctact	840
ggacagtata	cgctttccc	tcttccaccc	accttgccca	cccctgttgt	ccagctccac	900
ccccctgcttc	ctgacccttc	tgctccaacg	cccaccccta	ccagccctct	tctaaacaca	960
tcctacaccc	actcccagaa	tctgtcttag	gaaggg			996
<210>	32					
<211>	996					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	cDNA sequence encoding hTPO mutein 40434					
<400>	32					
agcccggttc	ctcctgcttg	tgacctccga	gtcctcagta	aactgcttcg	tgactccat	60
gtccttcaca	gcagactgag	ccagtgccca	gaggttcacc	cttgcctac	acctgtcctg	120
ctgcctgctg	tggactttag	cttggagaaa	tggaaaaccc	agatggagga	gaccaaggca	180
caggacattc	tgggagcagt	gacccttctg	ctggagggag	tgtatggcagc	acggggacaa	240
ctgggaccca	cttgcctctc	atccctcctg	gggcagcttt	ctggacaggt	ccgtctcctc	300
cttggggccc	tgcagagcct	ccttggaaacc	cagcttcctc	cacagggcag	gaccacagct	360
cacaaggatc	ccaatgccat	cttcctgagc	ttccaacacc	tgctccgagg	aaaggtgcgt	420
ttcctgatgc	ttgttaggagg	gtccaccctc	tgcgtcaggc	gggccccacc	caccacagct	480
gtccccagca	gaacctctct	agtccctaca	ctgaacgagc	tcccaaacag	gacttctgga	540
ttgttggaga	caaacttcac	tgcctcagcc	agaactaacg	gatctggct	tctgaagtgg	600
cagcaggat	tcaagccaa	gattcctgg	ctgctgaacc	aaacctccag	gtccctggac	660
caaatccccg	gatacctgaa	caggatacac	gaactttga	atggaactcg	tggactcttt	720
cctggaccct	cacgcaggac	cctaggagcc	ccggacattt	cctcaggaac	atcagacaca	780
ggctccctgc	cacccaacct	ccagcctgga	tatttcctt	ccccaaacca	tcctcctact	840
ggacagtata	cgctttccc	tcttccaccc	accttgccca	cccctgttgt	ccagctccac	900
ccccctgcttc	ctgacccttc	tgctccaacg	cccaccccta	ccagccctct	tctaaacaca	960
tcctacaccc	actcccagaa	tctgtcttag	gaaggg			996

<210> 33

<211> 996

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cDNA sequence encoding hTPO mutein 40449

<400> 33

agcccggtc ctccgttg tgacctccga gtccttagta aactgcttcg tgactccat 60
gtccttcaca gcagactgag ccagtgccca gaggttcacc cttgcctac acctgtcctg 120
ctgcctgctg tggactttag ctggggagaa tggaaaaccc agatggagga gaccaaggca 180
caggacattc tgggagcagt gacccttctg ctggagggag tcatggcagc acggggacaa 240
ctgggaccctt cttgcctctc atcccttcctg gggcagcttt ctggacaggt ccgtctcc 300
cttggggccc tgcagagttt aaacggaacc cagcttcctc cacagggcaa caccacagct 360
cacaaggatc ccaatgccat ctccctgagc ttccaacacc tgctccgagg aaaggtgcgt 420
ttcctgatgc ttgttaggagg gtccaccctc tgcgtcagggc gggccccacc caccacagct 480
gtccccagca acacgtctct agtcctcaca ctgaacgagc tcccaaacag gacttctgga 540
ttgttggaga caaacttcac tgcctcagcc agaactactg gctctggct tctgaagtgg 600
cagcagggat tcagagccaa gattccttgtt ctgctgaacc aaacctccag gtccctggac 660
caaatccccg gatacctgaa caggatacac gaactttga atggaactcg tggactctt 720
cctggaccct cacgcaggac cctaggagcc ccggacattt cctcaggaac atcagacaca 780
ggctccctgc caccacacct ccagcctgga tatttcctt ccccaaccca tcctcctact 840
ggacagtata cgctttccc tctccaccc accttgccca cccctgttgtt ccagctccac 900
cccctgcttc ctgacccttc tgctccaacg cccaccccta ccagccctct tctaaacaca 960
tcctacaccc actccagaa tctgtctcag gaaggg 996

<210> 34

<211> 996

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cDNA sequence encoding hTPO mutein 40458

<400> 34
agcccggtc ctccctgcttg tgacctccga gtcctcagta aactgcttcg tgactccat 60
gtccttcaca gcagactgag ccagtgccca gaggttcacc cttgcctac acctgtcctg 120
ctgcctgctg tggactttag ctggggagaa tggaaaaccc agatggagga gaccaaggca 180
caggacattc tgggagcagt gacccttctg ctggaggag tgatggcagc acggggacaa 240
ctgggaccca cttgcctctc atccctcctg gggcagctt ctggacaggt ccgtctcctc 300
cttggggccc tgcagagcct ctttggAACc cagttcctc cacagggcag gaccacagct 360
cacaaggatc ccaatgccat ctccctgagc ttccaacacc tgctccgagg aaaggtgcgt 420
ttcctgatgc ttgttaggagg gtccaccctc tgcgtcaggc gggccccaaa caccacagct 480
gtccccagca acacgtctct agtcctcaca ctgaacgagc tcccaaacag gacttctgga 540
ttgttggaga caaacttcac tgcctcagcc agaactactg gctctggct tctgaagtgg 600
cagcagggat tcagagccaa gattcctggt ctgctgaacc aaacctccag gtccctggac 660
caaatccccg gatacctgaa caggatacac gaactcttga atggaactcg tggactctt 720
cctggaccct cacgcaggac cctaggagcc ccggacattt cctcaggaac atcagacaca 780
ggctccctgc cacccaaacct ccagcctgga tatttcctt ccccaaccca tcctcctact 840
ggacagtata cgctttccc tcttccaccc accttgccca cccctgtggt ccagctccac 900
cccctgcttc ctgacccttc tgctccaacg cccaccccta ccagccctct tctaaacaca 960
tcctacaccc actcccagaa tctgtctcag gaaggg 996